

THÈSE

présentée

devant l'Université Claude-Bernard de Lyon

pour obtenir

le diplôme de Docteur-Ingénieur

par

Georges REVERSAT

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA BIOLOGIE D'UN NEMATODE PHYTOPARASITE : *HETERODERA ORYZAE*

Soutenue le 4 juin 1971

devant la Commission d'Examen

MM. NIGON

Président

BRUN

FOURCHE

} Examineurs

Travaux de la Section de Biologie Générale et Appliquée
de l'Université Claude-Bernard de LYON

Travaux du Laboratoire de Nématologie de l'Office
de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer

G e o r g e s R E V E R S A T

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA BIOLOGIE D'UN NEMATODE PHYTOPARASITE :
HETERODERA ORYZAE

OFFICE DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE
OUTRE MER

Laboratoire de Nématologie
Centre d'Adiopodoumé
Côte d'Ivoire

Section de Biologie
générale et appliquée

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD
LYON



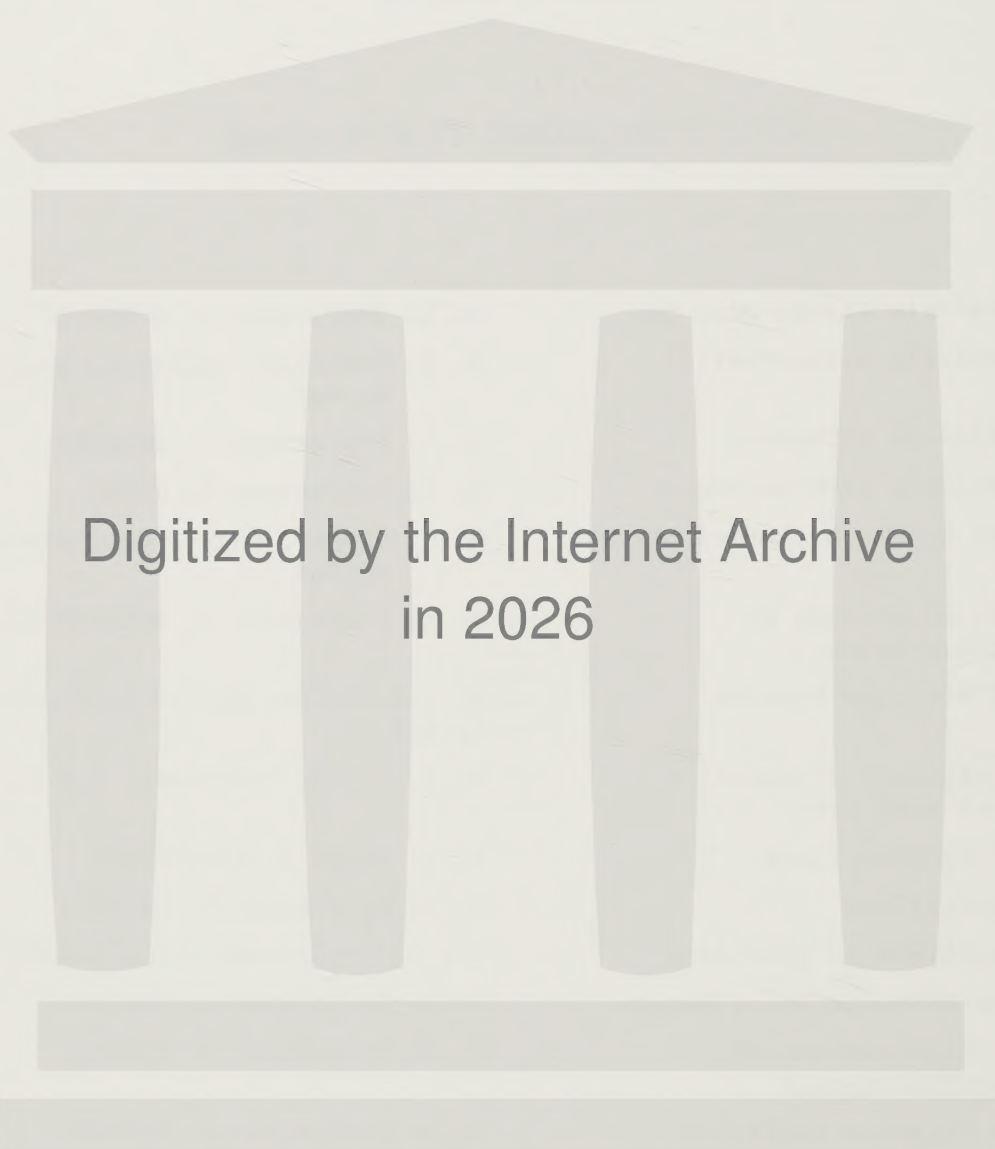
UNIVERSITE CLAUDE - BERNARD
L Y O N

Président : M. le Professeur J. BOIDIN
1er Vice-Président : M. R. TOURAINE, Maître de Conférences agrégé
2ème Vice-Président : M. P. PONCET, Maître-Assistant
3ème Vice-Président : M. D. SETTELEN, Etudiant

UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

U.E.R. médicale Grange-Blanche	M. le Professeur D. GERMAIN
U.E.R. médicale Alexis-Carrel	M. R. TOURAINE, Maître de Conférences agrégé
U.E.R. médicale LYON-Nord	M. le Professeur A. BERTOYE
U.E.R. médicale LYON-Sud-Ouest	M. le Professeur L. TOLOT
U.E.R. des Sciences pharmaceutiques	M. M. CARRAZ, Maître de Conférences agrégé
U.E.R. des Techniques de Réadaptation	M. le Professeur P. MOUNIER-KÜHN
U.E.R. de Biologie humaine	M. J.C. CZYBA, Maître de Conférences agrégé
Institut régional d'Education physique et sportive	M. J. SAPIN, Professeur E.P.S.
U.E.R. de Mathématiques	M. le Doyen J. BRACONNIER
U.E.R. de Physique	M. le Professeur M. DUFAY
U.E.R. de Chimie et Biochimie	M. le Professeur D. GAUTHERON
U.E.R. des Sciences de la Nature	M. le Professeur L. DAVID
U.E.R. de Biodynamique et Psychopédagogie	M. le Professeur J. CHANEL
U.E.R. de Physique nucléaire	M. le Professeur A. SARAZIN
Institut Universitaire de Technologie I	M. le Professeur L. FEUVRAIS
Institut Universitaire de Technologie II	M. J. GALLET
Observatoire	M. le Professeur J.H. BIGAY

Secrétaire général : M. N.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546306_0040

Ce travail a été effectué sous la direction de Monsieur le Professeur NIGON. Qu'il me soit permis de lui exprimer ici ma profonde gratitude pour l'aide et la confiance qu'il m'a accordées tout au long de ce travail.

Je remercie vivement Monsieur BRUN, Maître de Conférences, d'avoir bien voulu s'intéresser à mon travail et d'avoir accepté de le juger.

Monsieur FOURCHE, Maître Assistant, m'a prodigué ses conseils et a accepté de participer au jury de ma thèse. Qu'il trouve ici le témoignage de ma reconnaissance.

Ce travail, effectué au Laboratoire de Nématologie de l'ORSTOM à Adiopodoumé (Côte d'Ivoire), a été supervisé localement par Monsieur LUC, Inspecteur général de recherches, auquel j'exprime mes plus vifs remerciements.

Je remercie Monsieur MERNY, Maître de recherches principal, ainsi que Monsieur NETSCHER, Chargé de recherches, et Monsieur de GUIRAN, Maître de recherches, du Laboratoire de Nématologie de l'ORSTOM, dont l'aide amicale et les conseils m'ont été précieux.

Je suis redevable à Messieurs les chercheurs des Services de Physiologie végétale et de Phytopathologie de l'ORSTOM de leurs conseils pour la réalisation de certains aspects de ce travail.

Je remercie le personnel du laboratoire de Nématologie de l'ORSTOM à Adiopodoumé pour son assistance dans la réalisation pratique de ce travail.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Madame SZAFRANEK pour le soin qu'elle a apporté à la présentation de ce texte.

RESUME

Le travail porte d'une part sur l'élevage au laboratoire d'un nématode parasite du riz, *Heterodera oryzae* et, d'autre part, sur la mesure de l'intensité respiratoire de kystes et d'oeufs de ce parasite par la méthode du ludion.

1. En élevage xénique, une fraction d'un inoculum de larves pénètre dans les racines du riz. L'importance de la fraction infestante augmente avec la densité des racines ; elle est supérieure en culture sèche par rapport à sa valeur en culture submergée. La valeur de cette fraction infestante diminue durant la conservation de la souche au laboratoire. La plupart des larves qui ont pénétré dans l'hôte parviennent au stade adulte.
2. En élevage monoxénique sur plante entière, la fraction infestante de l'inoculum constitué de larves stérilisées, est plus élevée qu'en élevage xénique. La plupart des larves qui ont pénétré dans l'hôte deviennent adultes.
3. En élevage monoxénique, sur racines excisées, la pénétration ne se fait que dans une catégorie particulière de racines. La fraction infestante de l'inoculum est du même ordre qu'en élevage monoxénique sur plante entière. Le développement ultérieur des larves pénétrées n'aboutit que rarement à la formation d'adultes.
4. Dans l'eau, l'intensité respiratoire de kystes est de l'ordre de 10^{-2} $\mu\text{l d'O}_2$ par heure par kyste. Ramenée au nombre d'unités vivantes de chaque kyste (larve ou oeuf), l'intensité respiratoire moyenne est de $0,7 \cdot 10^{-4}$ $\mu\text{l d'oxygène}$ par heure (écart type $0,26 \cdot 10^{-4}$) par unité. Dans une solution qui inhibe leur éclosion, des oeufs extraits de kystes montrent une intensité respiratoire quatre fois plus faible.

S O M M A I R E

INTRODUCTION	
Ière PARTIE : ELEVAGE ET BIOLOGIE D' <i>HETERODERA ORYZAE</i>	3
INTRODUCTION	3
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES : CYCLE D' <i>HETERODERA ORYZAE</i>	3
1. Cultures de l'hôte	5
2. Inoculations	9
3. Pénétration et développement	12
4. Discussion	18
CONCLUSIONS GENERALES DE LA Ière PARTIE	25
IIème PARTIE : ETUDE RESPIROMETRIQUE D' <i>HETERODERA ORYZAE</i>	27
CHAPITRE 1 : TECHNIQUE DU LUDION	27
INTRODUCTION	27
1. Matériel	27
2. Manipulation	32
3. Discussion	39
CHAPITRE 2 : MESURES D'INTENSITE RESPIRATOIRE	39
INTRODUCTION	39
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES : LA SORTIE DES LARVES DES KYSTES D' <i>HETERODERA</i>	40
1. Résultats des mesures au ludion	41
2. Discussion	43
CONCLUSIONS GENERALES DE LA IIème PARTIE	47
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE	48
PLANCHES ET FIGURES HORS TEXTE	

I N T R O D U C T I O N

Un oeuf de nématode phytoparasite contient au terme de son développement, une larve morphologiquement complète. Cette larve, une fois éclosée, constitue le stade infestant du cycle du parasite. Chez certaines espèces au moins, l'éclosion de cette larve présente la particularité de pouvoir être différée, selon un déterminisme inconnu, pendant des durées plus ou moins longues. Chez certains *Heterodera*, ce temps de conservation peut atteindre plusieurs années.

Ce phénomène présente une incidence pratique certaine. En effet, un des moyens de lutte les plus utilisés consiste à interrompre la culture de la plante hôte par un assolement ou une jachère. Dans ces conditions, l'absence d'hôte doit conduire le parasite à décliner. Cependant, la possibilité d'éclosions retardées peut maintenir l'infestation potentielle d'un sol au delà des limites de temps rentables pour ces pratiques.

Il présente également un intérêt scientifique, car cette survie implique une utilisation ménagée des réserves par un métabolisme ralenti. Il convenait de vérifier d'abord ce point en effectuant au cours du temps un bilan global du métabolisme, que permet d'approcher la mesure de paramètres respirométriques. Le but du présent travail est d'entreprendre cette étude sur les oeufs d'*Heterodera oryzae*.

PLAN DU TRAVAIL

Le travail a été conduit dans deux directions principales, à chacune desquelles correspond une partie de l'exposé.

La partie I concerne l'élevage du parasite. Elle comprend en particulier la mise au point de méthodes d'élevages qui permettent d'obtenir des animaux débarrassés d'organismes contaminants dont la présence fausserait les mesures respirométriques.

La partie II concerne la respirométrie. Elle comprend tout d'abord la mise au point d'une technique adaptée (Chapitre 1), puis des mesures (Chapitre 2).

I è r e P A R T I E

ELEVAGE ET BIOLOGIE D'*HETERODERA ORYZAE*

INTRODUCTION

Le genre *Heterodera*, radicicole, demeure jusqu'à présent strictement parasite. Son élevage se décompose en trois phases successives :

1. *Culture de l'hôte* : l'hôte se développe dans un contenant sur un substrat qui assure sa nutrition.
2. *Inoculation* : l'inoculum, composé d'animaux au stade infestant, est déposé dans le contenant.
3. *Pénétration et développement* : les animaux pénètrent dans l'hôte et suivent un développement complet à l'issue duquel sont produits des oeufs, origine de la génération suivante.

Un élevage est dit *xénique* quand à l'hôte et au parasite sont associées des espèces contaminantes en nombre indéterminé. Un élevage est dit *monoxénique* quand à l'hôte n'est associé que le parasite à l'exclusion de toute autre espèce. Cet élevage monoxénique est le résultat du dépôt d'un inoculum *axénique* (sans espèce associée) sur la culture axénique (idem) de l'hôte.

La description du cycle d'*Heterodera oryzae* précèdera l'étude des trois phases.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES : CYCLE D'*HETERODERA ORYZAE* (Planche 1)

Heterodera oryzae (LUC et BERDON, 1961) est un parasite du riz. Son développement comprend quatre stades larvaires et un stade adulte, séparés

par quatre mues (BERDON et MERNY, 1964). L'espèce, bisexuée, est amphimictique (NETSCHER, 1969).

1. *Le second stade larvaire* (larve II) : il se constitue à l'intérieur des enveloppes de l'oeuf, après la première mue. C'est dans cet état, lovée et inactive, que la larve II reste jusqu'à son éclosion qui intervient dans des délais variables.

Une fois éclos, dans le sol, la larve II se déplace et rencontre une racine dans laquelle elle pénètre à l'aide de son stylet. Les larves II qui n'ont pas pénétré voient leur capacité de pénétration diminuer et devenir nulle au bout de 30 jours environ (MERNY, 1966 a), puis elles meurent.

2. *Le développement endophyte* : la larve II pénétrée se fixe dans la racine. Au contact de son extrémité antérieure apparaît après quelque temps une zone de lyse des parois cellulaires de la racine, sans hypertrophie. Il est vraisemblable que ce syncytium est dû à l'action des enzymes salivaires de la larve et qu'il lui sert de milieu nutritif (LEE, 1967).

Dans cette position se succèdent les trois mues suivantes. La différenciation sexuelle, ébauchée dès le troisième stade larvaire, apparaît complète au stade adulte. Le mâle, de forme allongée, est plié en trois dans les cuticules des deux mues précédentes. La femelle présente une forme plus ou moins sphérique.

3. *Le stade adulte* : la femelle reste sessile, mais fait saillie à l'extérieur de la racine grâce à l'éclatement des tissus végétaux dû à son développement. Une masse gélatineuse, émise par la femelle, adhère à sa cuticule autour de la vulve. Après s'être libéré de ses enveloppes, le mâle, mobile, rencontre la femelle et la féconde. Les premiers oeufs sont visibles dans la masse gélatineuse entre 20 et 25 jours après la pénétration. Si, après la pénétration, les plantes sont cultivées en milieu liquide, la fécondation n'a pas lieu et les mâles sédimentent (Communication personnelle de NETSCHER).

Les oeufs pondus, en nombre maximum de l'ordre de 500 par femelle, sont répartis à peu près également entre la masse gélatineuse et le corps de la femelle. L'ensemble de la masse gélatineuse et des oeufs qu'elle contient est appelé masse d'oeufs. La femelle meurt, ses téguments durcissent et se colorent en brun. L'ensemble de cette enveloppe et des oeufs qu'elle contient constitue le kyste. Après quelques semaines, le kyste et la masse d'oeufs peuvent être trouvés dans le sol, séparés de la racine. A ce stade, les oeufs contiennent des larves II susceptibles d'éclore.

1. CULTURES DE L'HÔTE

1.1. Culture xénique de la plante entière

1.1.1. Préparation des contenants

Le substrat est constitué soit de terre de forêt (débarrassée de nématodes par autoclavage) et d'eau, soit de sable (lavé aux acides) avec une solution nutritive minérale adaptée au riz (YOSHIDA & al., 1959).

Les contenants sont des récipients cylindriques (en verre, terre ou plastique) de capacités diverses (piluliers de 47 cm³ - pots de 200 cm³). Ils sont le plus souvent opaques, afin d'éviter l'exposition à la lumière des racines qui se développent contre leurs parois. Certains à fond étanche, permettent une culture submergée, d'autres à fond ouvert, une culture sèche.

1.1.2. Mise en place de l'hôte

Des graines de riz (*Oryza sativa*, variété *Morobérékan*) non décortiquées sont mise à germer. Deux procédés ont été successivement employés. Le premier procédé (MERNY, 1966 b) consiste à déposer les graines sur du papier filtre humide dans une boîte de Petri à la lumière naturelle. Le second procédé consiste à placer les graines sur un tamis métallique, sous un asperseur d'eau à l'obscurité. Dans les deux cas, après cinq jours, les plantules sont repiquées dans les contenants. On en place une par pilulier, tandis qu'en pot, leur nombre peut être variable (1-3-4-8, etc ...).

1.1.3. Manipulations ultérieures

Les contenants sont placés en serre dans les conditions ambiantes. La température moyenne est de l'ordre de 28°C (avec des températures maxi-mini de l'ordre de 30-23°C). Le degré hygrométrique est de 90 %. L'intensité lumineuse mesurée au luxmètre Guerpillon présente les caractéristiques suivantes :

	Serre	Extérieur
Couvert	1 500-2 000	30 000-40 000
Ensoleillé	3 000-5 000	>50 000

1.1.4. Résultats

Après germination sous asperseur, le riz présente une chlorose précoce depuis son repiquage jusqu'à la fin de la troisième semaine environ. Elle est généralement plus marquée sur sable et solution nutritive que sur terre et eau. Cependant, un test de carence (CONTREIRAS & al., 1959) n'a pas révélé d'insuffisance du milieu de YOSHIDA.

1.2. Culture axénique de la plante entière (planche 2)

La méthode utilisée est dérivée de celles de PITCHER & al., 1960 et de MAC RAE & CASTRO, 1967.

1.2.1. Préparation des contenants

Le substrat est composé de sable (granulométrie comprise entre 50 μ et 250 μ) et de solution de YOSHIDA à la concentration 5/1. La solution contient 0,5 g/l de glucose afin d'aider la révélation des contaminants.

Dans des tubes à essais en pyrex de 18 x 180 sont introduits successivement 9 cm³ de solution nutritive, puis 19,5 g de sable. Les tubes sont bouchés par un tampon de coton hydrophile imprégné au cuivre (du coton hydrophile est immergé pendant 10 heures dans une solution contenant pour un litre : 250 g de sulfate de cuivre, 500 cm³ d'ammoniaque concentrée et de l'eau qsp. Après un rinçage prolongé, le coton est séché à l'étuve à 30°C). Les tubes sont autoclavés à 120°C pendant 30 minutes.

1.2.2. Mise en place de l'hôte

En salle stérile, les graines de riz, décortiquées, sont stérilisées pendant 30 minutes dans le chlorure mercurique à 0,1 %, puis rincées à l'eau stérile. Une graine est déposée par tube (croquis B, planche 2).

Les tubes sont placés verticalement en serre. Après cinq jours, la plantule présente un coléoptile de 10 à 30 mm de long et une radicule de 1 à 3 mm de long (croquis C, planche 2). La graine est alors enfouie dans le sable, en serre et sans déboucher le tube. En inclinant le tube, un espace en coin se forme entre le sable et la paroi (croquis D, planche 2). Quelques chocs suffisent à y entraîner la graine (croquis E, planche 2). En redressant doucement le tube, la graine est enfouie dans le sable à une profondeur de 5 à 10 mm (croquis F, planche 2). Cet enfouissement est nécessaire, sinon la racine ne s'enfonce pas dans le sable, ce qui rend le tube impropre à l'inoculation.

1.2.3. Manipulations ultérieures

Les tubes sont laissés en serre (voir 1.1.3.) sur des portoirs pleins (croquis G, planche 2) qui protègent de la lumière les racines qui se développent contre leurs parois. Ces portoirs sont recouverts d'une couche de peinture d'aluminium, qui a pour effet d'empêcher les condensations le long des parois internes des tubes.

Vers le 9-10ème jour, en salle stérile, est mis en place dans chaque tube un tamis d'arrêt en toile d'acier inoxydable à maille de 250 μ (croquis G, planche 2). Ce tamis, fabriqué en forçant une pièce de toile avec un bou-

chon est introduit à l'aide de pinces (figure 5). Il évite à la partie aérienne le contact du coton imprégné au cuivre.

1.2.4. Résultats

Les graines stérilisées donnent de 5 à 20 % de contaminations pour la plupart fongiques (les genres *Helminthosporium* et *Curvularia* sont fréquemment rencontrés). La stérilisation ne présente pas de phytotoxicité sensible. Un renforcement de la stérilisation (concentration en HgCl_2 , durée) n'améliore pas le rendement à la stérilité avant d'atteindre des conditions phytotoxiques.

La partie aérienne atteint le tamis vers le 13^{ème} jour et s'enroule sur elle-même à son contact (croquis H, planche 2). Vers la 8^{ème} semaine, la partie aérienne, longue de 25-30 cm, comprend 2-3 feuilles et le système racinaire, long de 4 cm, comprend une racine principale et des racines adventives (4-6). Ces longueurs correspondent environ au tiers du développement observé en culture xénique.

Il n'y a pas, comme dans la culture xénique, de chlorose précoce : la plante présente d'emblée une coloration soutenue (avec ou sans glucose). Par contre, vers 8-10 semaines et dans un pourcentage de tubes croissant avec le temps, apparaît une chlorose tardive. La mort des plants intervient au bout de 12 semaines environ. Les dates de ces deux événements (chlorose et mort du plant) ne sont pas modifiées par divers changements de concentration du milieu.

1.3. Culture axénique de racines excisées (planches 3 et 4)

1.3.1. Préparation des contenants

Le milieu de base est celui qui a été mis au point par FUJIWARA & OJIMA (1954) pour la culture de racines excisées de riz en milieu liquide. Ce milieu de base additionné d'agar (Difco) à 1,5 % est appelé *milieu normal*. Ce milieu normal, supplémenté avec 0,1 % d'hydrolysate de caséine (Merck, 2238) et 0,1 % d'extrait de levure (Difco, 0127-01) est appelé *milieu supplémenté*.

Le milieu est préparé en deux fractions de volumes égaux. La fraction I contient l'agar dans de l'eau bouillante. La fraction II, qui contient tous les autres éléments dans de l'eau à la température ambiante, est ajustée à pH 5 à l'aide d' HCl 0,1 N. Puis les deux fractions sont mélangées pour être réparties dans les tubes. Après l'autoclavage, le pH final du mélange est de 5,5, valeur optimale selon FUJIWARA & OJIMA. La figure 9 donne la courbe d'étalonnage de ce procédé.

Le milieu encore liquide est réparti dans deux séries de tubes de 18 x 180 en pyrex. La série I reçoit 10 cm³ de milieu par tube. Chaque tube de la série II contient un moule en verre en deux parties (croquis A, planche 4) et reçoit 15 cm³ de milieu (croquis B, planche 4). Les tubes sont bouchés par un tampon de coton cardé, puis autoclavés à 110°C pendant 20 minutes.

Les tubes de la série I sont refroidis sur des supports adaptés afin de donner des tubes de gélose inclinée. Les tubes de la série II sont refroidis verticalement. En salle stérile, le moule est enlevé (croquis C à E, planche 4), il subsiste un manchon de gélose (croquis F, planche 4).

1.3.2. *Mise en place de l'hôte*

Après la stérilisation des graines (voir 1.2.2.) deux méthodes sont employées :

- *Explant* : après 5-6 jours de germination en boîte de Petri sur gélose à 1 %, non nutritive, stérile, la partie distale de la racine (sur 10 mm) est prélevée au scalpel puis déposée dans un tube de gélose inclinée (croquis B 1, planche 3).
- *Germination directe* : la graine stérilisée est soit déposée sur la gélose d'un tube de gélose inclinée (croquis B 2, planche 3), soit insérée entre la gélose et la paroi d'un tube de gélose en manchon (croquis G, planche 4). Dans le cas d'un tube de gélose inclinée, la germination est facilitée si le tube est laissé incliné pendant les 2-3 premiers jours pour que l'eau résiduelle baigne la graine. La germination se fait à l'étuve à 28°C à l'obscurité.

Les racines sont alors sectionnées en dessous du collet à l'aide d'un scalpel adapté (figure 6), puis la partie aérienne et la graine sont éliminées. La coupure doit intervenir au maximum 8-10 jours après la mise en place de la graine, sinon la croissance de la partie aérienne qui s'appuie contre le coton, entraîne la graine vers le fond du tube.

1.3.3. *Manipulations ultérieures*

Les tubes sont placés verticalement dans une étuve à 28°C à l'obscurité. Le degré hygrométrique est de 20 à 30 %.

1.3.4. *Résultats*

La stérilité des graines est identique à celle observée pour la plante entière (voir 1.2.4.). La méthode de l'explant donne un faible pourcentage de contaminations pour la plupart bactériennes.

Sur gélose inclinée avec milieu normal, un explant donne une racine qui se développe à la surface de la gélose. Les ramifications sont courtes,

de faible diamètre et incluses dans la gélose (croquis C, planche 3).

Sur gélose inclinée avec milieu supplémenté, un explant croît d'abord sur quelques centimètres à la surface de la gélose en ne donnant que des ébauches de ramifications. Ensuite, il gagne l'espace entre verre et gélose et développe à partir de ce moment de nombreuses ramifications, longues et d'un bon diamètre (croquis D, planche 3).

Entre verre et gélose, la racine est incluse dans la gélose sauf sur une partie de sa périphérie où elle touche le verre (figure 10 A). Les ramifications possédant la même propriété, on peut, après avoir sorti la gélose du tube, dégager l'ensemble des racines sans léser la gélose (figure 10 B). L'empreinte en creux des racines subsiste à la surface de la gélose.

Sur gélose inclinée avec milieu supplémenté, la germination directe donne plusieurs racines (une principale et des adventives). La plupart d'entre elles se développent entre verre et gélose ; une ou deux se développent à la surface de la gélose en donnant des ramifications qui restent en position superficielle (croquis E, planche 3). Au point de vue diamètre et longueur, les racines et leurs ramifications présentent un développement supérieur entre verre et gélose par rapport à la surface de la gélose.

Sur gélose en manchon avec milieu supplémenté, la germination directe donne aussi plusieurs racines, toutes situées entre verre et gélose (croquis I, planche 4). Elles présentent une bonne croissance et de nombreuses ramifications.

En milieu supplémenté est observée une coloration brune des racines qui n'apparaît pas en milieu normal. Elle débute par les parties les plus anciennes vers 4-6 semaines, puis s'étend jusqu'au tiers environ de la longueur des racines. Des modifications diverses (nature et concentration du sucre, concentrations de l'extrait de levure et de l'hydrolysate de caséine) n'empêchent pas l'apparition de cette coloration.

2. INOCULATIONS

2.1. Choix de l'inoculum

Les oeufs des kystes comme ceux des masses d'oeufs éclosent en donnant des larves II. Cependant, en pratique, on emploie uniquement la masse d'oeufs et cela pour deux raisons. D'abord, les éclosions des masses d'oeufs étant beaucoup plus rapides que celles des kystes (MERNY, 1970), il est plus facile d'en obtenir des inoculums importants. Ensuite, *H. oryzae* étant la seule des deux espèces d'*Heterodera* connues localement à posséder une masse d'oeufs, leur emploi évite une contamination par la seconde espèce.

La masse d'oeufs peut être utilisée selon deux méthodes :

La première méthode, qui consiste à introduire directement la masse d'oeufs dans le contenant, présente deux inconvénients. D'abord une masse d'oeufs constitue un inoculum numériquement très variable. Ainsi, trois semaines après le début de leur étude, les éclosions ayant cessé, 60 masses d'oeufs ont donné en moyenne 227 larves (extrêmes 39-455) (figure 8). Ensuite, le nombre d'éclosions étant pratiquement proportionnel au temps pendant 2 semaines (figure 2), les nématodes pénètrent et commencent leurs développements à des dates différentes. Ce fait augmente l'hétérogénéité d'âge des animaux recueillis ultérieurement sur la racine.

La seconde méthode consiste à faire éclore les oeufs *in vitro* et à inoculer la suspension de larves II obtenue. Dans ce cas, le dénombrement à la loupe d'une partie aliquote de la suspension homogénéisée permet de chiffrer l'inoculum. De plus, l'hétérogénéité d'âge des larves peut être réduite par augmentation de la fréquence des collectes. Cependant, cette suspension ne peut pas être introduite directement dans certaines cultures : tubes de gélose inclinée.

2.2. Inoculation xénique

La souche d'*H. oryzae* utilisée est entretenue depuis 1961 au laboratoire par réinoculation sur riz (*Morobérékan*) toutes les cinq semaines environ d'une suspension de larves issues de masses d'oeufs.

On emploie, pour l'inoculation xénique, uniquement la suspension de larves II. Les masses d'oeufs nécessaires sont récoltées sur les racines de plants inoculés 4 à 5 semaines auparavant. Elles sont placées à éclore par groupe (50 à 200) dans l'eau sur des tamis en boîte de Petri (figure 1), soit aussitôt après leur récolte, soit après un traitement préalable par la solution de DROPKIN. Cette solution, NaCl 0,3 M, inhibe les éclosions des masses d'oeufs qui y sont immergées. Après quelques jours, lorsque les masses d'oeufs sont transférées dans l'eau, les éclosions reprennent. La figure 2 montre qu'elles sont alors plus rapides et plus nombreuses pour les masses d'oeufs traitées que pour les témoins placés directement dans l'eau.

Les fonds de boîte contenant les larves sont collectés tous les 3-4 jours, et réunis en une suspension qui est maintenue homogène et aérée, soit par bullage, soit par retournement. Après dénombrement, le volume contenant le nombre de larves désiré est prélevé à l'aide d'une pipette et répandu à la surface du substrat d'un contenant, où se développe du riz. L'âge des plants au moment de l'inoculation est compté en jours à partir de la mise en germination.

2.3. Inoculation monoxénique

L'inoculum, masse d'oeufs ou suspension de larves, provient de l'élevage xénique. La stérilisation de l'inoculum utilise deux antibiotiques : le 2-éthoxyéthyl mercure (abréviation EEM) et le sulfate de streptomycine (abréviation SS).

2.3.1. Stérilisation des masses d'oeufs (en salle stérile)

Les masses d'oeufs sont placées à tremper (figure 1) dans une solution EEM, SS (5 ppm-0,3 M). Le sel inhibe, durant le temps de stérilisation, les éclosions qui diminueraient l'inoculum. Après 8 jours, la solution est remplacée par une solution EEM, SS, NaCl (5 ppm-0,1 %-0,3 M). Deux jours après ce changement, les masses d'oeufs sont rincées de leur sel par un passage de trois heures dans la solution EEM, SS (5 ppm-0,1 %). Après cinq rinçages à l'eau stérile, les masses d'oeufs sont introduites individuellement dans les tubes de culture.

2.3.2. Stérilisation d'une suspension de larves (en salle stérile)

La suspension initiale est déposée sur filtre (OOSTENBRINK, 1960) de façon à sélectionner les larves actives. La stérilisation est réalisée par des changements successifs de milieux de suspension appropriés, à l'aide d'une centrifugeuse à godets basculants munie de tubes à vis stérilisables (figure 7). Les 15 000 larves II contenues dans les 7 cm³ du tube sédimentent en 30 secondes à 300-400 RPM. Le traitement comprend quatre étapes :

- Lavage au Cetavlon (détergent) à 0,1 % pendant 10 minutes.
- 3 rinçages à l'eau stérile.
- Séjour de 5 heures dans la solution EEM, SS (5 ppm-0,1 %) (figure 3).
- 8 rinçages à l'eau stérile.

Le contenu d'un tube est entraîné dans un erlen contenant de la solution de YOSHIDA 1/1 stérile. La suspension, homogénéisée par agitation, est répartie à l'aide de pipettes stériles.

2.3.3. Inoculations (en salle stérile)

Dans un tube avec plante entière (planche 2), la masse d'oeufs est déposée à la surface du sable avant la mise en place du tamis. Sur gélose inclinée, la masse d'oeufs est déposée à proximité des racines (figure 11) sur la gélose. Sur gélose en manchon, la masse d'oeufs est déposée dans une encoche pratiquée entre le verre et la gélose (figure 12).

La suspension est introduite uniquement dans des tubes avec plante entière. L'inoculation peut se faire à travers le tamis.

2.3.4. Résultats

La stérilité est évaluée directement dans les tubes de culture. Après stérilisation, les masses d'oeufs provenant de cultures sur terre donnent 50 à 80 % d'inoculums stériles, celles provenant de cultures sur sable jusqu'à 90 ou 100 %. Après stérilisation, une suspension de larves donne 70 à 90 % d'inoculums stériles.

La toxicité du traitement amène la moyenne des éclosions par masse d'oeufs à 89 (n=60, extrêmes : 0-319) pour une distribution semblable à celle de la figure 8. Juste après la stérilisation, un fort pourcentage des larves d'une suspension, immobile, présente un habitus (figure 4 B) différent de celui des larves mortes (figure 4 A). Ces larves immobilisées reprennent en quelques heures une activité normale en milieu aéré. Compte tenu des pertes (toxicité, entraînement) l'inoculum actif ne représente alors que 25 à 40 % de celui de la suspension initiale.

Lorsque la masse d'oeufs est déposée dans une culture de plante entière (planche 2), les éclosions ne peuvent pas être observées directement. Cependant, lors de l'étape suivante (voir 3.3.1.), la pénétration obtenue dans ces cultures montre que l'éclosion des masses d'oeufs se fait avec un bon rendement.

Dans les cultures de racines excisées sur gélose supplémentée en manchon (planche 4 et figure 12), les larves écloses sont visibles sous la loupe. 4-5 jours après la mise en place de la masse d'oeufs, de nombreuses larves se trouvent au contact des racines (jusqu'à 150 par tube).

Dans les cultures de racines excisées sur gélose supplémentée inclinée (planche 3 et figure 11), les larves sont également visibles sous la loupe. On n'observe jamais plus de 5 ou 6 larves à la fois. Ceci pouvait être dû à une inhibition de l'éclosion provoquée par un rinçage insuffisant du sel. Des inoculations ont donc été faites avec des masses d'oeufs qui, après stérilisation, étaient laissées des temps variables dans de l'eau stérile. Ce traitement n'a pas conduit à une augmentation sensible du nombre de larves visibles. Lors de ce séjour à la surface de la gélose (figure 11), la masse d'oeufs prend une coloration brune, ce qui ne se produit pas dans les deux autres cas (plante entière et gélose en manchon).

3. PENETRATION ET DEVELOPPEMENT

3.1. Méthodes d'étude

Un temps déterminé après l'inoculation, les racines sont examinées en vue de dénombrer les nématodes présents. Les conditions de chaque expérience

sont caractérisées par les paramètres donnés, ses résultats par les paramètres observés.

3.1.1. Définitions des paramètres

Les paramètres donnés sont : n , le nombre de répétitions égal au nombre de contenants recevant le même traitement ; x , l'inoculum égal au nombre de larves II déposées dans chaque contenant ; p , le nombre de plants par contenant ; g , l'âge des plants au moment de l'inoculation (voir 2.2.) et v , le volume de substrat par contenant. Le substrat est caractérisé par des paramètres qualitatifs concernant la nature du substrat solide (terre ou sable) et le mode de culture (sèche ou submergée).

Les paramètres observés sont : y , le nombre de larves II qui ont effectivement pénétré dans les racines du contenant ; y_f , le nombre de femelles formées et y_m , le nombre de mâles formés.

3.1.2. Estimation des paramètres observés

Deux méthodes distinctes sont employées :

- *Coloration* : 15 jours après l'inoculation, les racines sont colorées, après fixation par le lactophénol bleu coton à froid (de GUIRAN, 1966). Les racines d'un plant, étalées et serrées entre deux plaques de verre, sont examinées à la loupe binoculaire. Les nématodes, colorés, sont comptés ; on estime ainsi y .
- *Observation directe* : 4-5 semaines après l'inoculation, les racines sommairement lavées sont examinées dans l'eau sous la loupe binoculaire ; on estime ainsi y_f . Si 15 jours après l'inoculation les plants sont transférés en culture liquide, les mâles qui sédimentent peuvent être comptés ; on estime ainsi y_m .

3.1.3. Présentation des résultats

Les résultats obtenus en élevage xénique sont donnés par le tableau I-2. Celui-ci groupe les résultats obtenus au cours de cette étude ainsi que des résultats obtenus par plusieurs auteurs dans des expériences similaires.

Chaque expérience, caractérisée par n répétitions, possède un numéro à trois chiffres (Ne). Les expériences sont réunies par séries portant un numéro à deux chiffres (Ns). Les expériences d'une même série ont été inoculées le même jour à partir d'une suspension homogène de larves II. Les séries sont réunies en groupes, portant un numéro à un chiffre (N) et caractérisés chacun par une date et une modalité particulière :

- *Modalité A* : germination en boîte de Petri à la lumière, éclosions sans traitement par la solution de DROPKIN et homogénéisation par retournement.

- *Modalité B* : germination à l'asperseur, à l'obscurité, éclosions après traitement par la solution de DROPKIN et homogénéisation par bullage.

Le paramètre observé de chaque expérience est constitué par la moyenne arithmétique des résultats au cours des n répétitions, soit pour le nombre de larves pénétrées y , soit pour le nombre de femelles y_f . Ensuite sont indiqués des paramètres dérivés : la pénétration par plant (y/p) et le rendement de pénétration (y/x).

Bien que le paramètre observé diffère selon les expériences, il existe des possibilités de comparaison. Une première possibilité consiste à considérer que y_f est nécessairement inférieur à y . Une seconde possibilité, plus précise, consiste à estimer la pénétration à partir du nombre de femelles y_f et de l'indice andrique a ($a = y_m/y_f$). La détermination de l'indice andrique a été faite (expérience 3.6.1. : $a \approx 0,5$) dans les conditions d'une très faible densité de population.

Dans le genre *Heterodera* (WALLACE, 1963), l'indice andrique croît avec la densité de population ; la valeur obtenue ($a \approx 0,5$) peut donc être considérée comme un minimum. L'estimation de y , indiquée entre parenthèses sur le tableau (y) = $(1+0,5) y_f$, donnera une valeur par défaut de la pénétration.

Les résultats obtenus en élevage monoxénique, contemporains du groupe 3, sont indiqués dans le texte.

3.2. Pénétration en élevage xénique

3.2.1. Variabilité

- *Intraexpérience* : les répétitions d'une expérience présentent une variabilité importante. Ainsi la moyenne ($y=16,8$) de l'expérience 3.5.2. correspond aux chiffres :

0, 0, 1, 4, 4, 5, 5, 7, 7, 9, 10, 10, 13, 15, 15, 15, 16, 17, 18, 18, 19, 20, 21, 22, 26, 1.

La distribution observée ne suit pas une loi normale. Pour comparer deux moyennes, on a recours à la transformation $(y+0,5)^{1/2}$ (MERNY, 1966 b).

Une hypothèse simple permettrait d'attribuer cette variabilité à la plante. Les processus de résistance d'une plante à un nématode peuvent se situer au niveau de la pénétration (ROHDE, 1960 b) et sont généralement sous la dépendance d'un caractère génétique de la plante. Le riz utilisé dans ces expériences est issu d'un stock obtenu par sélection massale, et se trouve donc probablement hétérogène au point de vue génétique. Pour vérifier l'intervention d'une influence génétique au niveau de la plante, les graines habituellement utilisées (N) ont été comparées à des graines de la même variété issues d'une sélection généalogique suivie sur plusieurs générations (S), donc

génétiqnement homogènes*. Un lot de plantules de chaque origine a été inoculé à partir d'une même suspension de larves (une plantule de 5 jours est inoculée par 500 larves dans un pilulier de 47 cm³ avec sable et solution nutritive). Le tableau des résultats (Tableau I-1) montre que les variances sont semblables (les moyennes sont significativement différentes). La variabilité obtenue ne semble donc pas avoir une origine génétique au niveau de la plante.

	y_i	y	Calculs sur $Y_i = (y_i + 0,5) : 1/2$			
(N) n=25	0,0,2,2,2,3,4,6,7, 7,8,9,9,9,11,11,11, 12,14,16,17,19,32, 33,35.	11,2	$s^2=2,03$	F=1,05 F(2,5%) =2,44	Y=3,11	$s^2=2,08$ t=3,6
(S) n=18	1,7,10,11,14,15,19, 21,22,23,23,28,31, 32,37,40,41,48.	23,5	$s^2=2,13$		Y=4,68	t(0,01) =3,3

TABLEAU I-1

- *Interexpérience* : la capacité d'un plant est le nombre maximum de larves qui pénètrent dans les racines de ce plant dans des conditions données. Elle correspond à l'asymptote de la courbe de saturation d'un plant (courbe 3, figure 14). MERNY (1970) a montré que pour un plant de 15 jours, cette capacité est de 35 larves. Avec des plants de même âge, nous avons obtenu une courbe de saturation d'allure semblable (courbe 2, figure 14), mais dont l'asymptote est plus élevée (70 environ). De la même façon, avec des plants de 15 jours, MERNY (1966 b) obtient une portion de la courbe de saturation (courbe 1, figure 14) dont l'ordonnée est déjà supérieure à 35 alors que l'ébauche d'un palier n'apparaît pas encore.

Le rendement de pénétration (y/x) varie de façon aléatoire entre des expériences distinctes, réalisées dans des conditions identiques. Ainsi, les expériences 1.1.2. et 1.2.1. donnent des résultats différents. De même, les expériences 3.1.1. et 3.3.1. donnent des points qui sont significativement extérieurs à la courbe 3 (figure 14) ; par contre, l'expérience 3.2.1. donne un point inclus dans cette courbe.

Il semble, d'autre part, qu'une évolution se manifeste dans nos élevages. En effet, en 1965-66, date des expériences du groupe 1, le rendement de pénétration habituel était celui de l'expérience 1.2.1., soit 0,72 (Communication personnelle de MERNY). Dans des conditions identiques, nous n'ob-

* Fournies par M. JACQUOT, (I.R.A.T.), que nous remercions ici.

		Paramètres donnés							Paramètres observés				
S	n	Substrat		Hôte		Inoculum		Pénétration			Adultes		
		Sb	v	p	g	x/p	x	y	y/x	y/p	y _f	y _m	
1	20	T.S.	200	1	5	300	300	(11,2)	(0,20)	(11,2)	11		
	20	T.S.	200	1	5	470	470	(11,2)	(0,24)	(11,2)	32		
	20	T.S.	200	1	5	300	300	(14,2)	(0,14)	(14,2)	96		
2	11	Sa.I	47	1	15	100	100	(24,4)	(0,17)	(24,4)	3		
	11	Sa.I	47	1	15	100	100	(52)	(0,17)	(52)	16,3		
	11	Sa.I	47	1	15	300	300	(62)	(0,17)	(62)	34,8		
	11	Sa.I	47	1	15	900	900	(62)	(0,07)	(62)	41,4		
3	20	Sa.I	47	1	5	300	300	22	0,07	22			
	20	Sa.I	47	1	5	470	470	12,2	0,026	12,2			
	20	Sa.I	47	1	5	300	300	20,6	0,07	20,6			
	20	Sa.I	200	3	7	166	500	64,2	0,13	21			
	20	Sa.I	200	3	7	166	500	1,6	0,01	0,5			
	20	Sa.S	200	3	7	166	500	78,2	0,15	26			
	20	Sa.S	200	3	7	166	500	2,2	0,013	0,7			
	25	Sa.I	47	1	5	500	500	11,2	0,022	11,2			
	25	Sa.I	47	1	15	500	500	16,8	0,034	16,8			
	20	T.S.	200	16	5	6,2	100	(45,7)	(0,46)	(2,9)	30,3	15	
	5	T.I.	200	4	5	21	85	39	0,46	9,8			
	5	T.I.	200	4	5	21	85	12,2	0,15	3,0			
4	20	Sa.I	47	1	5	150	150	(14,2)	(0,09)	(14,2)			
	20	Sa.I	47	1	5	150	150	17,4	0,11	17,4			

TABLEAU I-2

Substrat (Sb) : T : terre ; Sa : sable (Sa : sables de granulométrie particulière, p. ci-dessous) ; S : culture sèche ; I : culture submergée.

Groupe 1 : MERNY, 1966 b. Modalité A

Groupe 2 : 1968. Modalité A

Groupe 3 : 1969-1970. Modalité B

Série 3.4 : 3.4.1. et 3.4.3., granulométrie < à 250 µ
3.4.2. et 3.4.4., granulométrie > à 250 µ

Série 3.5 : REVERSAT et MERNY, en préparation

Série 3.6 : NETSCHER, Communication personnelle

tenons plus en 1970 qu'un rendement de 0,15 (expérience 3.8.1.). La valeur du rendement obtenu dans les conditions optimales en 1970 : 0,46 (expérience 3.6.1.) est encore significativement inférieure à 0,72.

3.2.2. *Influence du substrat*

La pénétration se fait le plus favorablement sur du sable de granulométrie comprise entre 50 μ et 250 μ (REVERSAT et MERNY, en préparation). Ainsi les expériences 3.4.1. et 3.4.2. d'une part et les expériences 3.4.3. et 3.4.4. d'autre part, montrent que sur un sable de granulométrie inférieure à 250 μ , la pénétration est 35 à 40 fois supérieure à celle obtenue sur un sable de granulométrie supérieure à 250 μ . Cependant, des substrats qui contiennent seulement une certaine fraction de leur poids en granulométrie inférieure à 250 μ permettent une pénétration normale. Ainsi, la terre de forêt contient environ 13,6 % de son poids en granulométrie inférieure à 200 μ , de même le sable employé dans les expériences contient environ 20 % de son poids en granulométrie inférieure à 250 μ .

Les expériences 3.4.1. et 3.4.3. montrent que la pénétration est supérieure dans le cas d'une culture sèche par rapport à celle qui se produit dans une culture submergée.

3.2.3. *Influence du nombre de plants par contenant*

Le rendement de pénétration augmente avec le nombre de plants par contenant. Ainsi, avec un plant, le rendement varie de 0,02 à 0,07 (séries 3.1. à 3.3.), avec 3-4 plants, le rendement varie de 0,13 à 0,15 (expériences 3.4.1., 3.4.3. et 3.8.1.), et avec 16 plants, ce rendement atteint 0,46 (expérience 3.6.1.).

3.2.4. *Influence de l'origine du parasite*

Mariscus umbellatus est un hôte médiocre d'*H. oryzae* (MERNY, 1966 b). Une inoculation massive de larves sur une culture de cette plante a produit quelques masses d'oeufs. La capacité de pénétration sur le riz des larves issues de masses d'oeufs a été comparée à celle de la souche ordinaire (expériences 3.7.1. et 3.8.1.). Le rendement de pénétration est trois fois plus important pour la souche issue d'un passage sur cet hôte différent.

Des échantillons de terre ont été prélevés dans divers terrains où *H. oryzae* avait été trouvé antérieurement (MERNY, 1966 b). Du riz a été planté sur ces échantillons puis, au bout de 4 semaines, les masses d'oeufs récoltées ont été mises à éclore. Les larves issues de ces éclosions donnent une pénétration identique à celle de la souche d'élevage.

3.3. Pénétration en élevage monoxénique

3.3.1. *Elevage monoxénique sur plante entière*

Dans 30 à 40 % des tubes observés, la pénétration atteint 60 larves par plant inoculé à 15 jours (inoculum de 120 à 140 larves).

3.3.2. *Elevage monoxénique sur racines excisées*

Sur gélose inclinée avec milieu normal (croquis C, planche 3), aucune pénétration n'est obtenue. Sur gélose inclinée avec milieu supplémenté et explant (croquis D, planche 3), de rares pénétrations sont observées sur la partie de la racine qui se développe entre verre et gélose. Sur gélose inclinée avec milieu supplémenté et germination directe (croquis E, planche 3), on obtient de rares pénétrations dans les racines entre verre et gélose, mais jamais dans celles situées à la surface de la gélose.

Sur gélose en manchon (croquis I, planche 4), la pénétration obtenue est très importante. Elle atteint 50 larves par tube chaque fois que l'inoculum libéré par la masse d'oeufs est assez élevé, de 100 à 150 larves.

Sur plante entière, la pénétration des larves n'est pas localisée en un point précis des racines (BERDON & MERNY, 1964). Toutes nos observations sur plante entière confirment ce fait. Par contre, sur racines excisées, le contact des larves avec les racines se produit, pour 90 à 95 % des larves visibles, au niveau de la partie subapicale des racines. Lors des comptages après coloration, les larves pénétrées sont trouvées presque exclusivement dans la partie distale de la racine sur 1 à 2 cm.

3.4. Développement

Sur plante entière, le pourcentage des larves pénétrées qui ne conduisent pas à un développement complet (mâle ou femelle) est très faible, que ce soit dans l'élevage xénique ou dans l'élevage monoxénique. Par contre, sur racines excisées, les larves pénétrées poursuivent rarement leur développement jusqu'au stade adulte. Dans des tubes de gélose en manchon qui présentaient une pénétration de l'ordre de 50 larves, on obtenait au maximum 8-10 femelles. La plupart des autres larves n'avaient subi qu'un développement incomplet.

4. DISCUSSION

4.1. Culture de l'hôte

4.1.1. *Développement de la plante entière*

La chlorose précoce de la plante entière est observée en culture xé-

nique et non en culture axénique. Son origine est donc à chercher parmi les méthodes qui différencient les deux cultures. Les essais pratiqués (concentration du milieu, test de carence minérale, avec ou sans glucose) n'ont pas réussi à révéler une influence de la composition du milieu nutritif. L'hypothèse la plus vraisemblable met en cause la différence portant sur les modalités de germination de la graine. En culture axénique (en milieu submergé et à la lumière naturelle), le coléoptile se développe plus vite que la racicule (respectivement 10-30 mm et 1-3 mm au 5ème jour). En culture xénique (sous l'asperseur et à l'obscurité), c'est au contraire la racicule qui se développe plus vite que le coléoptile (respectivement 30-50 mm et 10-30 mm au 5ème jour). Dans ce second cas, la valeur particulière du rapport racine/partie aérienne, liée aux influences de l'obscurité et du lessivage dû à l'aspersion (LANG, 1965) pourrait induire un désordre physiologique qui mettrait un certain temps pour être compensé.

La chlorose tardive de la plante entière observée en culture axénique a vraisemblablement pour origine la limitation de volume du contenant. Trois mécanismes possibles paraissent particulièrement évidents :

1. Déséquilibre des éléments par épuisement total ou sélectif du milieu.
2. Autointoxication par les exsudats racinaires.
3. Epuisement des réserves de la plante par excès de la respiration sur la photosynthèse. Cette dernière serait réduite par la diminution de la surface foliaire exposée à la lumière à la suite de l'enroulement de la partie aérienne sur elle-même. Tout en gardant à la technique sa simplicité, il serait sans doute possible de remédier à ces inconvénients en augmentant le volume du tube (tube de 25 × 250 au lieu de tube de 18 × 180).

4.1.2. Développement des racines excisées

Sur milieu supplémenté, la racine présente un meilleur développement entre verre et gélose qu'à la surface de la gélose. On est conduit à admettre qu'il existe une différence entre ces deux micromilieus. Deux possibilités quant à l'origine de cette différence paraissent particulièrement évidentes. La première possibilité consiste en un apport, par la dissolution du pyrex à la périphérie de la gélose, d'un élément minéral en concentration insuffisante dans la solution employée. La seconde possibilité concerne le dessèchement superficiel de la gélose dû à l'atmosphère sèche des étuves. Les racines de riz pourraient ne pas supporter la concentration locale du milieu qui en résulte et se développer vers du milieu plus dilué.

Le brunissement des racines est probablement l'indice d'une sénescence. Son déterminisme doit être lié à la composition du milieu et en particulier à la présence de l'extrait de levure et de l'hydrolysate de caséine puisqu'il ne se produit pas en milieu normal.

Ces résultats sont à relier aux difficultés inhérentes à la culture des racines excisées de monocotylédones (TORREY, 1965).

4.1.3. Stérilité des graines

Les contaminants fongiques apportés par les graines dans les cultures axéniques appartiennent essentiellement à deux genres (*Helminthosporium* et *Curvularia*) dont certaines espèces sont des parasites du riz. La contamination pouvant atteindre l'intérieur des graines (ANGLADETTE, 1966), elle serait alors moins accessible à la stérilisation. Ce résultat expliquerait que les essais de renforcement de la stérilisation n'aient pas abouti (voir 1.2.4.). Dans la mesure où la contamination interne des graines pourrait être décelée par certains symptômes, il semble possible d'améliorer le rendement de stérilité par un triage préalable des graines décortiquées.

4.2. Influence de divers facteurs sur l'éclosion des masses d'oeufs

4.2.1. Effet du groupement des masses d'oeufs

Les masses d'oeufs étudiées en groupe (courbe E, figure 2) et celles étudiées individuellement (figure 8) ont subi un traitement préalable de 5 jours par la solution de DROPKIN. Dans le premier cas, la moyenne des éclosions par masse d'oeufs est de 86,5 larves et dans le second cas de 227 larves. En prenant pour le premier résultat une variance identique à celle du second, les résultats sont significativement différents à 0,01. Il semble qu'il y ait dans ce résultat l'indice d'un effet de groupe sur l'éclosion.

ELLENBY (1946) a suggéré que les métabolites excrétés par les larves pourraient inhiber l'éclosion des oeufs dans les kystes. Cette hypothèse peut être reprise dans le cas des masses d'oeufs. L'espace de diffusion de ces métabolites correspond au volume d'eau dont dispose chaque masse d'oeufs : soit 0,3 cm³ pour les masses d'oeufs en groupe et 3 cm³ pour les masses d'oeufs seules. La concentration de métabolites provoquant l'inhibition serait plus vite atteinte dans le premier cas que dans le second cas. Le fait que l'eau soit renouvelée à chaque comptage suggère que l'effet de cet inhibiteur pourrait présenter une rémanence.

4.2.2. Effet du traitement des masses d'oeufs par le sel (figure 2)

D'après DROPKIN & al. (1960), l'inhibition de l'éclosion par une solution hypertonique est observée chez de nombreuses espèces de nématodes phytoparasites. Ce phénomène est très connu dans le cas des masses d'oeufs de *Meloidogyne*, genre qui appartient à la même famille qu'*Heterodera*. Si l'on admet que la pression osmotique ne fait qu'inhiber des éclosions qui auraient dû normalement se produire dans l'eau, il est compréhensible que lors du

transfert dans l'eau, le rythme soit plus rapide. Par contre, le fait que le nombre total des éclosions soit plus élevé pour l'essai (86,5 larves par masse d'oeufs) que pour le témoin (50,6 larves par masses d'oeufs) donne une autre portée au phénomène. Il semble que l'on provoque par ce moyen l'éclosion d'oeufs qui n'auraient pas normalement éclos.

Ce résultat peut s'intégrer dans l'hypothèse émise au paragraphe précédent. L'inhibiteur se trouverait à une concentration permanente dans la masse d'oeufs agissant sur une certaine fraction des oeufs. L'appel d'eau provoqué par le passage de la solution hypertonique à l'eau abaisserait cette concentration, permettant l'éclosion d'une fraction plus importante des oeufs. Il serait nécessaire de vérifier tout d'abord que cet effet secondaire du NaCl est bien dû aux propriétés osmotiques de ses solutions et non à des effets spécifiques de ses ions. A cet effet, l'expérience devrait être reprise avec des substances différentes, minérales ou organiques.

4.3. Les relations hôte-parasite

4.3.1. Mécanisme de la pénétration

A partir de l'inoculation, la pénétration se décompose en deux phases successives :

1. Le déplacement des nématodes depuis leur lieu de dépôt jusqu'au contact de la racine.
2. La pénétration elle-même.

D'après WALLACE (1963), les mécanismes susceptibles de rendre compte du déplacement peuvent se diviser en deux groupes. Le premier groupe n'implique pas une action à distance de la plante : le nématode en se déplaçant au hasard atteint la racine et s'y maintient grâce à une attraction localisée. Le second groupe implique une action à distance grâce à l'émission par la plante d'une substance à laquelle le nématode est sensible. Les diverses possibilités qu'ouvre ce second groupe sont résumées par le tableau suivant :

Effet de la substance	Attractif	Activateur	
Distribution de la substance	Gradient	Gradient	Uniforme

Dans le cas d'un gradient, le déplacement est orienté. Dans le cas d'une distribution uniforme, le déplacement se fait au hasard, mais plus rapidement qu'en l'absence d'un activateur.

Sur gélose inclinée (milieu supplémenté, germination directe, figure 11), les larves pénètrent dans les racines situées entre verre et gélose mais jamais dans les racines situées à la surface de la gélose. Ce fait suggère

1. A la différence de développement qui existe entre ces deux sortes de racines (voir 4.1.2.) correspond une différence qualitative de leur caractère attractif vis à vis du nématode. Les racines croissant entre verre et gélose, qui présentent le meilleur développement, possèderaient ce caractère attractif ; celles de la surface de la gélose en seraient dépourvues. Il est impossible de se prononcer sur une éventuelle action à distance de ce caractère, puisque le passage des larves entre verre et gélose peut aussi bien se faire par hasard.

2. Les deux sortes de racines sont qualitativement semblables pour leur caractère attractif vis à vis du nématode, mais la substance impliquée est volatile. Dans ces conditions, les racines situées à la surface de la gélose ne présenteraient pas de caractère attractif vis à vis des larves, par suite de la disparition rapide de la substance attractive dans l'atmosphère. La remarque donnée à la précédente hypothèse sur l'incertitude du rayon d'action de la substance attractive impliquée est valable également dans ce cas.

3. Les larves pénètrent entre verre et gélose à la suite d'un stimulus indépendant de l'hôte. On pourrait imaginer dans ce cas qu'il s'agisse d'un gradient (humidité, concentration saline) lié au dessèchement superficiel de la gélose.

Sur gélose en manchon (milieu supplémenté), la pénétration se fait préférentiellement dans la partie distale de la racine, contrairement au cas de la plante entière où elle semble répartie sur toute la longueur de la racine (voir 3.3.2.). Ce résultat pose une alternative :

- cette localisation existe aussi bien sur plante entière que sur racines excisées. La différence des répartitions observées par la suite dépendrait des modalités de croissance respectives des racines de plante entière et des racines excisées.

- cette localisation est un effet spécifique des cultures de racines excisées et n'existe pas dans le cas de la plante entière. Seules les parties distales des racines excisées, qui présentent un bon état physiologique, possèderaient un caractère attractif pour les larves. Les parties proximales, sénescents, en seraient dépourvues.

L'augmentation du rendement lié à l'augmentation du nombre de plants pourrait être dû à deux effets compatibles :

1. L'augmentation de la densité de racines diminuerait la distance de déplacement d'une larve depuis son lieu de dépôt jusqu'à la racine. Dans la mesure où les capacités énergétiques individuelles des larves d'un inoculum donné sont très variables, la diminution de l'effort à fournir permettrait à une fraction plus importante de l'inoculum de pénétrer.

2. L'augmentation de la densité des racines accroîtrait dans le substrat la concentration d'une substance activatrice émise par la plante (voir ci-dessus).

L'effet de la submersion est vraisemblablement à rattacher à l'oxygénation du substrat (WALLACE, 1963). Une particularité physiologique du plant de riz permet une hypothèse intéressante. La racine de riz émet de l'oxygène dans le milieu (AIMI, 1960). Il paraît vraisemblable dans ces conditions que l'oxygénation du substrat en condition submergée soit assurée en partie par ce phénomène et en partie par diffusion à partir de la surface. L'augmentation de la densité des racines pourrait accroître l'oxygénation du milieu et permettre à une plus grande fraction des larves d'utiliser leurs réserves énergétiques. De même, lors de la culture sèche, l'oxygénation par diffusion serait supérieure à celle observée lors de la culture submergée.

4.3.2. Variabilité de la pénétration

Le manque de reproductibilité de la pénétration se situe à deux niveaux.

Le premier niveau présente un aspect aléatoire et il est vraisemblablement lié au vieillissement de l'inoculum. Les larves d'*H. oryzae* placées dans le sol perdent peu à peu leurs possibilités de pénétration (MERNY, 1970). WALLACE (1966), obtenant un résultat analogue avec des larves de *Meloidogyne* l'attribue à l'épuisement progressif des réserves énergétiques. La baisse d'agressivité étant assez rapide pendant les premiers jours, un écart d'un ou deux jours lors de la collecte des larves expliquerait la variation de l'agressivité moyenne du lot utilisé.

Le second niveau révèle une baisse de la pénétration proprement dite. Celle-ci se traduit d'une part par la diminution de la capacité de la plante, et d'autre part par la diminution du rendement de pénétration (voir 3.2.1.). On distingue quatre possibilités d'explication dont la première paraît la plus vraisemblable.

- *Modification physiologique réversible* : elle proviendrait du changement des modalités d'élevage (A ou B, voir 3.1.3.). L'effet de celles-ci serait sensible :

- au niveau de la plante : l'état physiologique déficient de la plante (voir 4.1.1.) serait attribuable à la modalité B et perturberait l'expression des caractères génétiques dont dépendrait la capacité du plant et son caractère attractif.

- au niveau du nématode : la plante dans cet état constituerait un milieu nutritionnel déficient pour les femelles. Les capacités énergétiques de l'inoculum qu'elles produiraient seraient diminuées.

Cette hypothèse intègre sans difficultés le fait de la restauration

de la pénétration par l'augmentation du nombre de plants, les résultats obtenus par des changements d'origine du parasite (voir 3.2.4.) et les résultats obtenus en culture monoxénique.

- *Modification d'origine parasitaire* : il s'agirait d'un changement de l'état physiologique des larves dû à l'action d'un agent pathogène (virus, bactérie, champignon) (LOEWENBERG & al., 1959).

- *Modification génétique du parasite* : l'aptitude à la pénétration dépendrait d'un caractère polygénique du nématode. La baisse observée correspondrait au passage de l'équilibre qui était établi dans le milieu naturel où le nématode a été prélevé en 1961 à l'équilibre propre aux conditions d'élevage qui ne serait pas encore atteint.

- *Modification génétique de l'hôte* : la capacité de la plante et son caractère attractif dépendraient d'un caractère génétique susceptible de variation. La méthode employée au laboratoire pour renouveler le stock de graines favoriserait l'enrichissement du stock en gènes défavorables à la pénétration. La comparaison faite entre les graines du laboratoire et les graines venues de l'extérieur (3.2.1.) semble le confirmer. Cependant, il est possible que cette différence significative des moyennes (tableau I-1) soit due à une propriété physiologique de la plante liée aux passés différents des graines (date de récolte après la floraison, date de mise en germination après la récolte).

4.3.3. Développement

Le développement des larves pénétrées dans des racines excisées aboutit rarement à la formation d'adultes. Il existe deux explications possibles à ce résultat :

1. Les racines excisées subiraient une sénescence rapide qui les rendrait impropres à assurer le développement du nématode. Le brunissement ultérieur serait une manifestation tardive de cette sénescence. Seuls les nématodes pénétrés les premiers, avant que cette sénescence n'intervienne, parviendraient à suivre un développement complet.
2. Les racines excisées présenteraient une déficience permanente, les rendant impropres à assurer le développement du nématode. Le développement de certains d'entre eux pourrait être dû au fait que les exigences vis à vis du milieu peuvent différer dans une certaine mesure, selon les individus. Des cultures généalogiques par l'intermédiaire des masses d'oeufs recueillies sur racines excisées permettraient peut-être de sélectionner une lignée capable de se développer dans ces conditions. Mais elles pourraient aussi conduire à une dégénérescence progressive.

CONCLUSIONS GENERALES DE LA Ière PARTIE

1. ELEVAGES MONOXENIQUES

L'élevage monoxénique du nématode sur la plante entière est au point et offre un moyen valable d'obtenir du matériel dépourvu de contaminants en vue d'études respirométriques. Cette technique permet d'envisager des élevages généalogiques, avec une rigueur d'isolement que ne présente pas la culture xénique. Cependant, elle laisse prévoir une certaine variabilité individuelle et génétique au niveau de la plante.

L'élevage sur racines excisées ne permet pas, dans son état actuel, de fournir du matériel comme la technique précédente à cause d'une déficience du milieu utilisé. Par contre, ses résultats ouvrent des perspectives sur l'analyse des exigences physiologiques du comportement et du développement du nématode.

2. PENETRATION DES NEMATODES

La pénétration du nématode dans les racines de la plante hôte se révèle être un phénomène complexe qui semble dépendre de nombreux paramètres. L'influence de certains d'entre eux commence à être connue grâce aux résultats de cette étude qui vient ainsi compléter des travaux antérieurs (BERDON et MERNY, 1964 ; MERNY, 1970 ; REVERSAT et MERNY, en préparation).

Certains autres facteurs dont dépendent les variabilités aléatoires et systématiques des résultats obtenus sont simplement pressentis. Ils se situeraient aux niveaux génétique et physiologique aussi bien du parasite que de l'hôte. Certains des résultats peuvent conduire à définir la méthodologie qui permettra de soumettre ces hypothèses à des expérimentations ultérieures.

3. FACTEURS D'ECLOSION DES MASSES D'OEUFs

Les hypothèses concernant les mécanismes des éclosions chez les kystes ne sont pas en contradiction avec les résultats que nous avons obtenus concernant l'éclosion des masses d'oeufs. On sait que le kyste et la masse

d'oeufs manifestent par ailleurs des propriétés différentes dans la cinétique de l'éclosion de leurs oeufs (MERNY, 1970). Il semble donc intéressant d'envisager une comparaison plus complète au niveau des paramètres respirométriques. Dans cette optique, le fait de travailler avec une des rares espèces d'*Heterodera* qui possèdent une masse d'oeufs d'un contenu en oeufs comparable à celui du kyste paraît représenter une position avantageuse.

I I è m e P A R T I E

ETUDE RESPIROMETRIQUE D'*HETERODERA ORYZAE*

CHAPITRE 1 : TECHNIQUE DU LUDION

INTRODUCTION

La technique du ludion s'imposait à cause de sa sensibilité. La valeur de la respiration d'un kyste d'*H. rostochiensis*, $0,5 \cdot 10^{-2}$ μ l/heure (SEMBDNER & al., 1961) entre dans les possibilités les plus courantes de cet instrument. Parmi les adaptations de cette technique (HOLTER & ZEUTHEN, 1966) a été retenue la version du ludion simple (FOURCHE, 1957 ; NIGON & FOURCHE, 1958). Le principe de l'appareil est rappelé par la figure 15 et le ludion simple est schématisé par la figure 16 A.

LINDERSTROM-LANG & HOLTER (1942) ont montré que la bulle d'air d'un ludion perd par diffusion une quantité de gaz proportionnelle au temps et à la section de diffusion (S_d , figure 16 A). Cette diminution de la quantité de gaz provoque une dérive proportionnelle de la pression d'équilibre. L'introduction d'un kyste (diamètre 0,5 mm) dans un ludion simple et sa récupération aisée à la fin de la manipulation demandent un diamètre interne (d , figure 16 A) de l'ordre de 0,8-1 mm. Dans ces conditions, la dérive de diffusion obtenue est importante et rend toute mesure imprécise. La solution consiste à munir le ludion d'un bouchon qui réduit la diffusion. Un tel ludion a été décrit par ZEUTHEN (1950). Son principe est illustré par la figure 16 B. Le bouchon permet de disposer d'un diamètre important pour une section de diffusion faible, réduite à une étroite couronne circulaire.

1. MATERIEL

1.1. Appareil (planches 10 et 11)

L'appareil est dérivé du modèle défini par FOURCHE (1957).

1.1.1. *Bain thermostaté*

Un aquarium contenant environ 140 litres d'eau est enfermé dans un coffrage isotherme (CT). La température de l'eau est maintenue constante ($T_b = 28^\circ\text{C}$) par un chauffage électrique comprenant : un thermomètre à contact (TC), un relais (RE) et un appareil (U) contenant une résistance et une pompe mélangeuse. La température de la pièce est de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ et l'apport de lumière naturelle, diffuse, est très faible. Le coffrage est percé d'une fenêtre avant (F.AV) et d'une fenêtre arrière (F.AR) au niveau desquelles le verre de l'aquarium est doublé par une seconde vitre qui contribue à limiter les déperditions thermiques. L'évaporation est limitée par un couvercle en deux parties, l'une fixe (CF), l'autre mobile (CM). L'ouverture de ce dernier donne accès à la surface supérieure de l'aquarium.

1.1.2. *Système manométrique*

Un manomètre à lecture monobranche (MM) est fixé sur une planche verticale. Son capillaire (CP), vertical, est placé sur un réglet métallique (R) de un mètre, gradué au 1/2 mm. Son réservoir contenant 80 cm^3 d'éthanol coloré de densité $D_e (= 0,789 \text{ à } 20^\circ\text{C})$, est isolé dans un coffrage (CRA) garni de laine de verre.

La branche de gauche du manomètre (au dessus du réservoir) est reliée au régulateur de pression (RP) et à un robinet à trois voies (R2). La deuxième sortie de ce robinet est à l'air libre, la troisième est reliée par un tube (TFF) à une rampe de robinets plats (RRP) solidaire de la partie fixe du couvercle. Chaque robinet donne accès par un tube souple à un flacon de flottaison (FF) immergé dans le bain. Il y a dix flacons. Chacun d'eux contient 15 cm^3 de soude N/10 de densité $D_s (= 1,00 \text{ à } 28^\circ\text{C})$. Cette soude, renouvelée chaque semaine, est préparée avec de l'eau saturée en air à 28°C par bullage.

La branche de droite du manomètre (au dessus du capillaire) est reliée à un robinet à trois voies (R1). La deuxième sortie de ce robinet est à l'air libre, la troisième est reliée par un tube (TBR) à une bouteille de référence de 5 litres qui, lestée, est immergée dans le bain.

Les différentes parties de verre ou de métal sont reliées par du tube à vide en caoutchouc.

1.1.3. *Système optique*

La fenêtre arrière est munie d'un tube fluorescent (E). Sur la face avant du coffrage sont fixées deux équerres métalliques supportant un banc d'optique (BO), horizontal et parallèle à la rangée de flacons. Un viseur (V) muni d'un réticule est solidaire d'un sabot qui peut circuler sur ce banc. Le ludion (voir figure 15) est ramené lors de la mesure de la pression d'équi-

libre, en coïncidence avec le réticule. De cette façon, la pression hydrostatique d'équilibre F est constante d'une mesure à l'autre.

1.1.4. Mesure des pressions

- *Définitions* : lorsqu'un ludion est à l'équilibre (figure 15), on distingue H , la *pression manométrique d'équilibre*, de P , *pression absolue d'équilibre*. La première correspond à la lecture du manomètre ; la seconde, qui correspond à la pression des formules des gaz parfaits, est une fonction complexe que l'on peut exprimer par la relation (1)

$$(1) \quad P = P_{ao} + H + \Sigma(H)$$

Les quatre termes sont exprimés en mm d'éthanol à 20°C. P_{ao} est la pression normale (13 088 mm). Pour les calculs rapides $\Sigma(H)$ peut être négligé.

- *Variations de pression* : Entre un équilibre 1 et un équilibre 2, la variation de pression absolue $P_1 - P_2$ et la variation de pression manométrique $H_1 - H_2$ sont liées par la relation (2).

$$(2) \quad P_1 - P_2 = G.(H_1 - H_2) \quad \text{avec} \quad G = 1 + \frac{p.P_{ao}.Sc}{V_b} + \frac{Sc}{Sr}$$

Avec Sc : section du capillaire de mesure (3,14 mm²), Sr : section du réservoir du manomètre (1 300 mm²), p : coefficient égal à 1 mm pour 1 mm d'éthanol à 20°C et V_b : le volume de la bouteille de référence (5.10⁶ mm³).

Les deux termes littéraux de G représentent la dérivée de $\Sigma(H)$ par rapport à H et tiennent compte de la compression de l'air de la bouteille de référence et de la variation du niveau d'éthanol dans le réservoir. Avec les valeurs indiquées, $G = 1,01$.

1.2. Fabrication des ludions à bouchon

La sensibilité d'un ludion est liée directement à son volume gazeux. Pour cette raison ont été étudiés des ludions de volumes différents. Il s'est avéré nécessaire d'adapter le modèle de ludion à l'ordre de grandeur du volume désiré. Ceci a été obtenu en employant deux modèles de ludions. Le matériel sera décrit tout d'abord, puis seront données les fabrications des deux modèles.

1.2.1. Etirage des capillaires

Des capillaires, obtenus par étirage de tubes de pyrex (masse volumique $D_v = 2,224$ à 28°C), de diamètre interne 14-15 mm et d'épaisseur 1,5-1,8 mm

doivent présenter deux caractéristiques :

- *Ovalisation* : la solidarité mécanique du bouchon et de la chambre respiratoire d'un ludion à bouchon (figure 16 B) s'obtient en utilisant des capillaires ovalisés. Après la pénétration d'une pièce dans l'autre, une rotation permet un coincement (figure 17). L'ovalisation est obtenue de la façon suivante : après un chauffage uniformisé par rotation du tube dans la flamme, le tube est immobilisé 1 à 2 secondes pour créer une surchauffe dissymétrique. Le tube est alors sorti de la flamme et étiré en une brassée.

- *Flottabilité* (Planche 5) : un capillaire est défini par son diamètre interne d et son épaisseur e (croquis A, planche 5) (on néglige l'ovalisation, la conicité et les irrégularités de e). On imagine qu'un tronçon de ce capillaire est immergé dans un liquide de masse volumique D_s qui occupe une longueur L_1 du capillaire et qu'une bulle de gaz de longueur L_g subsiste à son extrémité. Ce capillaire flotte quand la poussée du liquide équilibre la masse du ludion. Soit en employant les valeurs du croquis A quand $D_s.(V_g + V_v) > D_v.V_v$. Les grandeurs e , d , L_1 , D_s et D_v étant fixées, la résolution de cette inéquation fixe la valeur minimum de L_g , $(L_g)_m$, par la relation (3).

$$(3) \quad (L_g)_m = K_1.L_1 \quad \text{avec} \quad K_1 = \frac{b.(D_v - D_s)}{D_s - b.(D_v - D_s)} \quad \begin{array}{l} b = 4 a(1+a) \\ a = e/d \end{array}$$

Le croquis C de la planche 5 donne pour $L_1 = 11$ mm (valeur qui sera utilisée par la suite) la courbe représentative de $(L_g)_m$ en fonction de a . Par exemple, sur ce graphique, pour un tronçon de capillaire de $d = 1$ mm et de $e = 0,08$ mm, $(L_g)_m = 8,3$ mm. La longueur totale du capillaire serait de $11 + 8,3 = 19,3$ mm.

1.2.2. Matériel commun (figure 20)

- *Ajustements capillaires* : la brassée coupée en son centre et aux deux extrémités donne deux capillaires légèrement coniques. Un capillaire est coupé à l'aide d'un cristal de carborundum en tronçons consécutifs de 30 mm. Ces tronçons sont posés à plat dans le prolongement l'un de l'autre, dans l'ordre et dans le sens qu'ils occupaient à l'origine dans le capillaire. L'ajustement est recherché en inversant l'ordre, mais en gardant le sens des tronçons. Quand un essai n'a pas réussi, les tronçons sont reposés à leur place initiale. L'ajustement se fait entre deux tronçons séparés par un ou plusieurs autres (2 à 6). Ce procédé permet de sélectionner au maximum 7 à 8 ébauches de ludion par capillaire.

La mesure du diamètre d et de l'épaisseur e d'un tronçon est faite à l'aide d'un dispositif schématisé par le croquis B de la planche 5 et

d'une loupe munie d'un micromètre oculaire étalonné.

- *Baguettes d'ajustement de masse* : l'ampoule résultant de l'étirage précédent est chauffée jusqu'à formation d'une masse homogène, puis étirée. La tige obtenue est coupée en baguettes de 50 mm. Ces baguettes ne doivent pas présenter de lumière centrale sous la loupe, sinon elles sont éliminées. Chacune est pesée, puis rangée selon sa masse : 1 à 2 mg, 2 à 3 mg, ..., 9 à 10 mg, 10 à 15 mg, ... Une pince à ongles permet, à l'aide d'un papier millimétré, de couper des tronçons de 0,5 mm de ces baguettes (soit 1/100 de la masse initiale). Sur des baguettes de masses élevées (10 à 15 mg), cet instrument permet d'enlever des éclats évalués à 1/500 de la masse initiale.

1.2.3. Fabrication du ludion à bouchon extérieur (planche 6)

Ce modèle de ludion est représenté par le schéma de la figure 18. Le volume gazeux à l'équilibre V_g est soit de 5, soit de 10 μl . La masse du ludion m (en mg) et son volume V_g sont liés par la relation (4).

$$(4) \quad m = M.V_g \quad \text{avec} \quad M = \frac{D_v \cdot D_s}{D_v - D_s}$$

Avec le matériel utilisé $M = 1,817$.

Deux paramètres de la fabrication de ce modèle sont fixés au préalable : L_1 qui est égal à 11 mm, soit 4 mm pour la chambre respiratoire, et 7 mm pour le bouchon, et V_g qui est à choisir entre deux valeurs, soit 5 soit 10 μl . La fabrication est schématisée par la planche 6. L'opération n° 2 comprend trois phases :

- *Détermination de $(L_g)m$* : on utilise le graphique C, planche 5. Son utilisation a été vue au 1.2.1.

- *Choix du volume V_g* : on utilise le graphique D, planche 5. I est le point d'intersection de la droite d'ordonnée $(L_g)m$ et de la droite d'abscisse d . On observe la position de I par rapport aux droites $V_g = 2,5-5-10 \mu\text{l}$.

Si I est à droite de $V_g = 10$, l'ajustement est éliminé.

Si I est entre les droites $V_g = 5$ et $V_g = 10$, l'ajustement est réglé à 10 μl .

Si I est entre les droites $V_g = 2,5$ et $V_g = 5$, l'ajustement est réglé à 5 μl .

Si I est à gauche de $V_g = 2,5$, l'ajustement est éliminé.

- *Détermination de L_g et réglage* : on utilise le graphique D de la planche 5. J est le point d'intersection de la droite V_g du volume choisi et de la droite d'abscisse d . L'ordonnée de J représente la valeur de L_g .

Avec l'exemple choisi ($d = 1$, $e = 0,08$) on obtient $(Lg)m = 8,3$ mm, $Vg = 10$ μ l et $Lg = 12,8$ mm.

Les ludions finis ne doivent pas présenter de bulles d'air incluses dans le verre, sinon ils sont éliminés.

1.2.4. Fabrication du ludion à bouchon intérieur (planche 7)

Ce modèle, schématisé par la figure 19, est adapté du modèle défini par ZEUTHEN (1950). Il est caractérisé par la présence d'un volume d'air Va inclus de façon définitive dans le bouchon et qui donne au matériau une densité moyenne Dg ($Dg < Dv$). Le volume gazeux à l'équilibre, Vg , qui varie, selon les ludions, de 0,5 à 1,2 μ l, est lié à la masse m par la relation (5).

$$(5) \quad m = Mg.Vg \quad \text{avec} \quad Mg = \frac{Dg \cdot Ds}{Dg - Ds}$$

Quatre paramètres de la fabrication sont fixés au préalable : $Dg = 1,051$ ($Mg = 20,83$), la longueur du bouchon ($Lb = 25$ mm), la longueur de la chambre respiratoire ($Lcr = 15$ mm) et la valeur maximum de a ($a \leq 0,1$). Ces valeurs ont été choisies telles que la condition de flottabilité soit toujours vérifiée. La fabrication est schématisée par la planche 7. Les opérations n° 6 et 8 comportent un *ajustement de densité* :

On dispose de trois solutions aqueuses de glycérine : l'une à 255 g/l de densité $Dg_1 = 1,0495$, l'autre à 257,5 g/l de densité Dg et la dernière à 260 g/l de densité $Dg_2 = 1,0525$. Le bouchon est introduit au maximum dans la chambre respiratoire garnie de solution de densité Dg , puis bloqué. On enlève ou on ajoute du verre jusqu'à ce que le ludion coule dans la solution de densité Dg_1 et flotte dans la solution de densité Dg_2 . Sa densité peut être alors considérée comme égale à Dg à 0,0015 unité de densité près.

De même que pour le précédent modèle, les ludions finis qui présentent des bulles d'air sont éliminés.

2. MANIPULATION

2.1. Garniture et mise en place des ludions

2.1.1. Matériel commun

Le montage employé pour chacun des liquides de rinçage est donné par le croquis A, planche 8. Une pression exercée par l'intermédiaire de l'embout permet d'avoir un débit liquide à l'extrémité du capillaire.

Des capillaires droits de 120 mm de long sont marqués à 65 mm d'une de leurs extrémités. A l'aide d'un capillaire thermométrique jaugé et d'eau

sont sélectionnés ceux dont V_p , le volume contenu dans ces 65 mm, est égal ($\pm 10\%$) à une série de volumes standard : 10-5-1,2-1,0-0,8-0,6-0,4 μl . Ces capillaires sont alors montés individuellement sur des tubes étirés (croquis C, planche 8) et un jaugage précis de V_p est réalisé par pesée de mercure.

La mise en place de la bulle d'air d'un ludion à l'aide d'une telle pipette est schématisée par le croquis B de la planche 8 : on isole entre deux gouttes d'eau une bulle d'air de volume connu V_r . V_r et V_g le volume gazeux du ludion à garnir sont liés par la relation (6).

$$(6) \quad V_r = R.V_g \quad \text{avec} \quad R = \frac{T_a}{T_b} \cdot \left(1 + \frac{H_o}{P_{ao}}\right)$$

H_o est la pression manométrique d'équilibre de la mesure théoriquement possible au moment du remplissage (figure 25). R tient compte des différences de température et de pression entre l'ambiance et la position d'équilibre dans le bain. Pour $H_o = 800$, $R = 1,04$.

Sur une pipette de volume V_p , proche du volume V_r , la longueur à mesurer ΔL_p sur le papier millimétré d'une pipette, à partir du repère (croquis C, planche 8) est donnée par la relation (7).

$$(7) \quad \Delta L_p = 65 \left(\frac{V_r}{V_p} - 1 \right) \quad (\Delta L_p \text{ est une valeur algébrique})$$

2.1.2. Manipulation du ludion à bouchon extérieur

- *Garniture en air* : ces ludions sont conservés individuellement en tube à essais dans le mélange sulfochromique. Après cinq rinçages à l'eau, le contenu du tube est versé sur un tamis où les deux pièces du ludion sont récupérées. Chacune est alors rincée puis remplie à l'eau distillée. La pipette du volume choisi est fixée sur l'appareil représenté par le croquis D, planche 8. Le réglage donné par la relation (7) est valable pour tous les ludions d'un même volume remplis à l'aide de la même pipette.

- *Blancs* : une fois la bulle d'air en place, la colonne d'eau du bas de la chambre respiratoire et l'intérieur du bouchon sont rincés à la soude N/10. Le bouchon est adapté puis bloqué sous un courant de soude pour éviter la formation de bulles d'air dans l'ajustement. A l'aide d'une baguette sur laquelle il adhère par capillarité, le ludion est déposé dans le flacon de flottaison où il flotte. Après la fermeture du flacon, H est amenée à 1 000 mm et le ludion coule. Il est maintenu sous cette pression en fermant le robinet plat correspondant.

- *Mesure sur un kyste* : la garniture de la chambre respiratoire avec le kyste et la bulle d'air est schématisée par la figure 23. Un certain volume d'eau entoure le kyste en place et lui évite la dessiccation. La densité du kyste et de l'eau qui l'entoure étant proche de celle du liquide de flottaison, il n'y a pas lieu d'effectuer une correction du volume gazeux. Le rinçage et la mise en place s'effectuent comme pour le blanc.

2.1.3. Manipulation du ludion à bouchon intérieur

- *Garniture en air* : elle est identique à celle du modèle précédent sauf sur quatre points :

1. Les ludions et leurs accessoires sont recouverts d'un enduit au silicone (Siliclad)* qui rend leur manipulation plus aisée.
2. Ils sont stockés dans un détergent neutre qui ne lèse pas cet enduit.
3. La pipette est fixée sur un support lesté (croquis E, planche 8), placé dans le champ d'une loupe de grand diamètre.
4. Le réglage donné par la relation (7) doit être fait pour chaque ludion.

- *Blancs* : le rinçage et la mise en place du bouchon sont identiques à ceux du modèle précédent sauf sur deux points :

1. Le repère en cire (voir planche 7) est rendu tangent au bord de la chambre respiratoire ; de cette façon, la longueur de diffusion L_d est constante d'une expérience à l'autre.
2. Le ludion est coulé à une pression supérieure de 20 mm d'éthanol à sa pression d'équilibre.

- *Mesure sur des oeufs* : les oeufs en suspension sont aspirés dans une pipette semblable à celle représentée par le croquis C, planche 8. Le volume liquide est diminué par des dépôts et des reprises successifs jusqu'à ce que les oeufs soient contenus dans une colonne liquide de 20-25 mm.

La suite de l'opération est réalisée sur un micromanipulateur. Le schéma de principe ainsi que les étapes de la mise en place des oeufs dans le ludion sont donnés par la planche 9. Cet appareil est placé sous une loupe binoculaire. Une fois les oeufs en place, le rinçage et la mise en place s'effectuent comme pour le blanc.

2.2. Blancs

Au cours d'un blanc, la pression d'équilibre des ludions est mesurée à intervalles rapprochés (1 à 2 heures) sur des temps de 8-10 heures. On parle

* Siliclad, CLAY ADAMS, Inc., New-York 10 1010 U.S.A.

de dérive positive quand cette pression augmente d'une mesure à l'autre, négative dans le cas contraire. On désigne par δH la valeur horaire de cette dérive. Nous verrons d'abord les causes de dérive, puis le comportement des deux modèles de ludion.

2.2.1. Les causes de dérive

- *Dérive de dissolution* : le pyrex d'un ludion se solubilise dans le milieu (NaOH N/10 à 28°C) proportionnellement au temps, à la surface de contact S_s entre le pyrex et le milieu et à un coefficient C_s . Ce coefficient, déterminé par pesée sur des tronçons de tube, est égal à $2 \cdot 10^{-6}$ mg par mm^2 et par heure. Cette diminution de la masse du ludion provoque une dérive positive dont la valeur horaire, $(\delta H)_s$, est donnée par la relation (8).

$$(8) \quad (\delta H)_s = P \cdot \frac{C_s \cdot S_s}{M \cdot V_g}$$

Les variations relatives de P et de V_g étant faibles, cette dérive est pratiquement constante.

- *Dérive de diffusion* : Cette dérive, négative, dont l'origine est décrite dans l'introduction, présente une valeur horaire donnée par la relation (9).

$$(9) \quad (\delta H)_d = - \frac{C_d \cdot S_d \cdot P_d}{V_g \cdot L_d} \cdot \frac{P_{ao} \cdot T_b}{T_o}$$

C_d le coefficient de diffusion, déterminé par la méthode de LINDERSTROM-LANG & HOLTER (1942) à l'aide du ludion schématisé par la figure 21, est égal à $0,24 \text{ mm}^3 \times \text{mm}$ par mm^2 par heure et par atmosphère. P_d , la pression de diffusion, est égale à la différence de la pression absolue de la bulle d'air du ludion et de la pression de dissolution de l'air dans le liquide de flottaison. Elle dépend essentiellement de la pression de repos du ludion entre deux mesures.

- *Dérive de mesure* : un ludion à bouchon contient, en deçà de la barrière de diffusion, un volume liquide V_l (figure 22) dans lequel l'air est solubilisé proportionnellement à la pression absolue de la bulle gazeuse. Lorsque cette pression diminue, en passant de la pression de repos à la pression d'équilibre (figure 24), une partie de l'air dissous se dégage et vient augmenter la quantité gazeuse de la bulle. Ce dégazage partiel se fait progressivement et la pression d'équilibre correspondante augmente. L'amplitude maximum de cette variation de la pression d'équilibre $(\delta H)_m$ est donnée par la relation (10).

$$(10) \quad (\delta H)_m = \frac{Vl. \alpha a. (Hr - H) + F.Ds/De}{Pao.Vg}$$

αa est le coefficient de solubilité de l'air dans le liquide de flottaison à 28°C (0,016 mm³ par mm³ par atmosphère).

La figure 24 représente la cinétique de l'augmentation de pression pour un ludion de 1 µl. La mesure de H, pression manométrique d'équilibre à l'instant t est impossible, en effet la mise en coïncidence du ludion avec le réticule prend un certain temps Δt . Dans ces conditions, la pression d'équilibre H mesurée est majorée d'une quantité ϵ . Il est nécessaire que la valeur de cette erreur ϵ soit constante d'une mesure à l'autre.

2.2.2. Comportement des deux modèles de ludions

Pour le ludion à bouchon extérieur, la lecture de H est stabilisée une heure après la mise en place du ludion. Pour les deux catégories de volumes (5 et 10 µl), on obtient des relevés de pression linéaires en fonction du temps. Seuls sont gardés les ludions présentant une dérive horaire (δH) de valeur absolue inférieure à 0,2 mm d'éthanol.

Le temps de stabilisation du ludion à bouchon intérieur est identique à celui du modèle précédent. Par contre, tous les ludions de ce modèle présentent une dérive positive de l'ordre de 1 à 2 mm d'éthanol par heure. De plus, le relevé des pressions n'est linéaire que lorsque l'écart entre la pression de repos et la pression d'équilibre est faible.

Les relations définies précédemment permettent de retrouver ces résultats. Tout d'abord, les dérivées de dissolution et de diffusion peuvent être calculées pour un ludion type de chaque modèle. Les résultats de ces calculs, ainsi que leur bilan, sont donnés dans le tableau page 37 pour un ludion à bouchon extérieur de 10 µl (LBE 10 µl) et un ludion à bouchon intérieur de 1 µl (LBI 1 µl).

Dans le cas du ludion à bouchon extérieur, les valeurs des deux dérivées sont faibles à cause du volume gazeux qui est important et les paramètres de construction sont tels que les deux dérivées se compensent. Dans le cas du ludion à bouchon intérieur, au contraire, les deux dérivées ne peuvent pas se compenser à cause des paramètres de construction. Ensuite la dérive de mesure intervient dans la linéarité des relevés de pression d'équilibre du ludion à bouchon intérieur. Comme ce modèle de ludion est peu maniable, le temps Δt (voir 2.2.1.) varie de 1 à 3 minutes, et la valeur de ϵ est variable. Cet effet est minimisé en réduisant le plus possible l'écart entre la pression de repos et la pression d'équilibre ; la valeur de $(\delta H)_m$ est alors très faible.

		L.B.I. 1 l		L.B.E. 10 l	
Dissolution	Ss mm ²	160		100	
	(δH)s mm/h	+ 2,30		+ 0,14	
Diffusion	Sd mm ²	0,05		0,05	
	Ld mm	11		5	
	(Hr - H) mm	1 000	0	1 000	0
	(δH)d mm/h	- 1,25	- 0,05	- 0,25	- 0,01
Résultante	δH mm/h	+ 1,05	+ 2,25	- 0,11	+ 0,13

Par contre, le ludion à bouchon extérieur est très maniable, et la mise en coïncidence du ludion avec le réticule demande 10 à 15 secondes ; la valeur d' δ est constante et de plus la valeur de (δH)m est très faible à cause du grand volume. Dans ce cas, l'effet de la dérive de mesure n'est pas sensible.

2.3. Mesures

Au cours d'une mesure sont effectués deux relevés de la pression d'équilibre (figure 25). Le premier H_1 a lieu au moins deux heures après la garniture (temps t_0) à un temps t_1 , donc après la période d'équilibration. Le second H_2 a lieu à un temps t_2 ultérieur. Entre les relevés H_1 et H_2 sont effectués deux autres relevés destinés à vérifier l'allure linéaire de la variation de pression, mais qui n'interviennent pas dans le calcul.

2.3.1. Calcul de l'intensité respiratoire

La variation horaire de la pression manométrique d'équilibre, ΔH , est d'abord donnée par la relation (11), t_1 et t_2 étant exprimés en heures.

$$(11) \quad \Delta H = (H_1 - H_2) / (t_2 - t_1) \quad \Delta H > 0$$

Cette variation horaire de la pression d'équilibre est corrigée en tenant compte de la dérive propre au ludion qui a servi à la déterminer. Dans le cas des ludions à bouchon extérieur, cette correction est négligée. Dans le cas des ludions à bouchon intérieur, la valeur de la dérive est ajoutée à la variation horaire de pression ($\Delta H + \delta H$).

On effectue ensuite une correction dite d'appareillage dont le principe a été vu au 1.1.4. On obtient ainsi la variation horaire de la pression absolue d'équilibre du ludion par la relation (12).

$$(12) \quad \Delta P = G \cdot (\Delta H + \delta H)$$

Enfin l'intensité respiratoire Q_{O_2} en μl d'oxygène par heure est obtenue par la relation (13).

$$(13) \quad Q_{O_2} = N \cdot \Delta P \quad \text{avec } N = \frac{Vg \cdot \frac{T_o}{T_b} + \alpha \cdot V_l}{P_{ao}}$$

N est la caractéristique du ludion (BOELL, 1960) : T_o est la température normale absolue (273°K), α est le coefficient de solubilité de l'oxygène dans le liquide de flottaison (0,027 mm³ par mm³ par atmosphère).

La relation (14) résume ces calculs.

$$(14) \quad Q_{O_2} = G \cdot N \cdot (\Delta H + \delta H)$$

2.3.2. Précision

Les causes d'erreur peuvent se limiter aux erreurs de mesure. En effet, les erreurs faites sur les autres éléments du calcul (Vg , V_l) sont de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-4} . L'erreur absolue de mesure est égale au double de l'erreur absolue de lecture. Cette dernière est évaluée à $\pm 0,5$ mm d'éthanol pour les ludions à bouchon extérieur et à ± 1 mm d'éthanol pour les ludions à bouchon intérieur. L'erreur relative sera donc d'autant plus faible que la variation de pression ($H_1 - H_2$) sera plus importante.

2.3.3. Variation de la pression partielle d'oxygène

La décroissance de la pression partielle d'oxygène au cours d'une mesure est donnée par la relation (15).

$$(15) \quad r = 1 - (1 - r_o) \frac{P_o}{P}$$

La droite représentative de cette fonction pour le remplissage d'un ludion effectué avec de l'air ($r_o = 0,21$) est donnée par la figure 26. P_o représente la pression absolue d'équilibre à l'instant de la garniture t_o (figure 25). Pour une variation de la pression manométrique d'équilibre ($H_1 - H_2$) égale à 200 mm d'éthanol, la baisse relative de la pression partielle d'oxygène est de 7 %.

3. DISCUSSION

Les méthodes de fabrication rationnelles des deux modèles sont rapides. Il faut une heure pour la fabrication d'un ludion à bouchon extérieur et deux heures pour celle d'un ludion à bouchon intérieur. Cette facilité tient à ce que le matériel présentant des caractéristiques défavorables est éliminé à un stade précoce par le contrôle de flottabilité. L'ajustement de densité du ludion à bouchon intérieur est aisé : on passe de la densité Dg_2 à la densité Dg_1 en 4 à 5 coupures par éclat.

La mise au point d'accessoires divers (pipettes de rinçage, dispositifs de maintien des pipettes à air, micromanipulateur, enduit au silicone) permet une mise en oeuvre rapide. Pour charger avec des kystes et mettre en place 10 ludions à bouchon extérieur, il faut de 1 à 1,5 heure. La même opération pour 10 ludions à bouchon intérieur avec des oeufs demande de 3 à 4 heures. De plus, les différentes étapes tiennent compte du fait que le matériel étudié ne supporte pas la dessiccation.

La formule de transformation employée (13) tient compte de tous les facteurs. D'après BOELL (1960), un étalonnage biologique montre que deux ludions donnent, pour un matériel homogène, des résultats semblables.

La présence des trois dérives (voir 2.2.) gêne considérablement la manipulation du ludion à bouchon intérieur. La dérive de mesure a reçu une solution satisfaisante : mettre la pression de repos (H_r) à peine supérieure à la pression d'équilibre (H). Ce modèle de ludion présente un intérêt théorique très important : on peut, en effet, en modifiant certains paramètres de sa construction, obtenir des volumes aussi faibles qu'on veut, donc augmenter la sensibilité. Ceci est irréalisable avec le ludion à bouchon extérieur dont le volume minimum est de 2 à 2,5 μ l. Il serait donc avantageux d'améliorer le comportement du ludion à bouchon intérieur en réduisant la dérive de dissolution, de façon à ce qu'elle compense la dérive de diffusion. Ceci doit être possible en modifiant soit la qualité du verre, soit la nature et la concentration du milieu de flottaison.

CHAPITRE 2 : MESURES D'INTENSITE RESPIRATOIRE

INTRODUCTION

La mesure de l'intensité respiratoire de nématodes phytoparasites demeure jusqu'à présent limitée. L'intensité respiratoire de kystes d'*H. rostochiensis* obtenus à partir de cultures xéniques a été mesurée au Warburg sur des lots de 200 kystes (SEMBDNER & al., 1961). Dans l'eau, l'intensité res-

piratoire est de l'ordre de $0,5.10^{-2}$ μ l d'oxygène par kyste et par heure. Considérée au niveau individuel du kyste, cette mesure semble englober des éléments assez divers. En effet, les oeufs d'un même kyste manifestent, à tout moment, des potentialités diverses vis à vis du phénomène d'éclosion. Ainsi, SHEPHERD (1962 a), analysant les résultats d'étude de l'éclosion de ces oeufs, établit la classification suivante :

1. Oeufs incapables d'éclore.
2. Oeufs prêts à éclore sous l'action d'un stimulant.
3. Oeufs non prêts à éclore.
4. Oeufs prêts à éclore dans l'eau.

Dans la mesure où cette classification correspondrait à des états physiologiques différents, les oeufs pourraient manifester des métabolismes d'intensités variables.

Nous verrons, avant d'aborder les résultats de mesures, quels sont les résultats qui conduisent à cette notion d'hétérogénéité.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES :

LA SORTIE DES LARVES DES KYSTES D'*HETERODERA*

1. *Généralités* : L'éclosion n'est pas, au moins pour certaines espèces, un phénomène passif. Chez *H. rostochiensis*, la larve II entre en activité dans l'oeuf avant l'éclosion (DONCASTER & SHEPHERD, 1967). Elle gagne ensuite une des deux ouvertures naturelles du kyste, qui correspondent à la bouche et à la vulve de l'ancienne femelle, puis sort du kyste. Les larves II d'un même kyste sortent progressivement au cours du temps ; il est donc possible de définir un taux de sortie entre deux dates données. De ces deux phénomènes successifs, l'éclosion et la sortie, le premier semble être limitant (WALLACE, 1963). Aussi, ce même auteur estime t-il équivalents les termes de taux de sortie et de taux d'éclosion.

2. *Conditions de milieu* : La sortie des larves II ne peut se produire que dans certaines conditions de milieu. Pour certains facteurs comme la température, la pression osmotique, l'humidité, le taux de gaz carbonique, la sortie ne se fait que dans des conditions optimales intermédiaires entre les extrêmes possibles de chaque facteur (SHEPHERD, 1962 a ; WALLACE, 1963). Par contre, la pression partielle d'oxygène présente un effet à minimum : le taux d'éclosions augmente linéairement avec le pourcentage d'oxygène jusqu'à 50 % en volume (air normal 21 %), puis reste constant (WALLACE, 1963).

3. *Effet de groupe* : les oeufs situés à la périphérie des kystes d'*H. rosto-*

chiensis éclosent les premiers (ONIONS, 1955). L'auteur suggère qu'un gradient de concentration d'oxygène décroît de la périphérie au centre du kyste et que les oeufs du centre sont inhibés par anoxie. Ce résultat est en accord avec l'influence de la pression partielle d'oxygène vue au paragraphe précédent. Un certain nombre d'hypothèses analogues ont été émises expliquant l'étalement des éclosions par un effet de groupe : WALLACE (1963) suggère que l'éclosion est inhibée par le gaz carbonique émis par les oeufs eux-mêmes ; ELLENBY (1946) pense que l'inhibition pourrait être produite par les métabolites excrétés par les larves.

Cependant, des oeufs extraits de kystes d'*H. rostochiensis*, donc soustraits à l'action de ces facteurs, éclosent à peine plus vite que des oeufs enkystés (FENWICK & WIDDOWSON, 1959). Il semble donc que ces facteurs ne soient pas seuls en cause. Ce résultat ménage la possibilité d'un déterminisme interne à l'oeuf, qui pourrait présenter une certaine analogie avec la diapause des insectes.

4. *Maturation* : Dans des conditions de milieu optimales, le taux de sortie n'est pas constant. Pour *H. cryzae*, il peut ne devenir sensible que 20 semaines après la collecte des kystes (MERNY, 1966 b). CUNNINGHAM (1960) a montré que des kystes d'*H. rostochiensis*, collectés en été, donnent des éclosions abondantes en hiver au laboratoire ; par contre, récoltés en automne, ils ne donnent que peu d'éclosions en hiver.

Il semble donc que certains facteurs, non déterminés, puissent induire soit une dormance, soit une maturation.

5. *Facteurs stimulants* : Dans des conditions de milieu optimales, un certain taux d'éclosion dans l'eau est observé, d'importance variable suivant les espèces. A partir de ces conditions, l'action de facteurs particuliers, physiques ou chimiques, peut stimuler considérablement le taux d'éclosion. Le plus important de ces facteurs est constitué par des exsudats racinaires de plantes. Généralement la plante hôte stimule l'éclosion de son parasite : ainsi, le riz exerce un effet stimulant sur l'éclosion d'*H. cryzae* (MERNY, 1970). Cependant, dans certains cas, la stimulation se fait en dehors de toute spécificité, une plante pouvant stimuler une espèce qui ne la parasite pas (SHEPHERD, 1962 a). D'autres facteurs sont également actifs : la phase colloïdale du sol (MERNY, 1970), des produits chimiques variés (SHEPHERD, 1962 a), des radiations (TOWNSHEND, 1967), etc ...

1. RESULTATS DES MESURES AU LUDION

Quels que soient le modèle de ludion employé et le matériel étudié, l'écart entre les deux mesures, $t_2 - t_1$ (voir Ch. 1, 2.3.), est de 5 heures.

1.1. Intensité respiratoire de kystes

Un lot de 10 kystes est extrait d'un tube d'élevage monoxénique sur plante entière, 10 semaines après l'inoculation par une masse d'oeufs. L'extraction se fait de la façon suivante : le tube débouché et débarrassé de son tamis est rempli d'eau stérile puis renversé sur un cristalliseur d'eau stérile. Le sable et la plante sédimentent. Les kystes sont prélevés un à un sur les racines à l'oeil nu et séparés de leur masse d'oeufs. Jusqu'à la manipulation, les kystes sont stockés stérilement et individuellement dans l'eau et dans des tubes avec support (figure 13). On place un kyste par ludion à bouchon extérieur de 10 μ l (voir ch. 1, 2.1.2.). Après la mesure, chaque kyste est traité au New Blue R (SHEPHERD, 1962 b) afin de colorer les oeufs morts. Une dissection de chaque kyste permet de compter les oeufs et les larves vivants : n représente le nombre total de ces éléments vivants. Le tableau II-1 donne les résultats des mesures pour ces dix kystes : la moyenne des intensités respiratoires par élément (colonne de droite) est de $0,68.10^{-4}$ et l'écart type de $0,26.10^{-4}$.

$H_1 - H_2$	Erreur relative	QO_2/kyste $\mu\text{l } O_2/\text{h}$	n	$QO_2/\text{élément}$ $\mu\text{l } O_2/\text{h}$
14,0	$7,0.10^{-2}$	$1,95.10^{-3}$	46	$0,42.10^{-4}$
82,5	$1,2.10^{-2}$	$11,45.10^{-3}$	233	$0,49.10^{-4}$
29,0	$3,5.10^{-2}$	$4,05.10^{-3}$	76	$0,53.10^{-4}$
165,0	$0,6.10^{-2}$	$22,90.10^{-3}$	128	$0,54.10^{-4}$
22,5	$4,5.10^{-2}$	$3,10.10^{-3}$	75	$0,57.10^{-4}$
26,0	$4,0.10^{-2}$	$7,65.10^{-3}$	65	$0,57.10^{-4}$
74,0	$1,3.10^{-2}$	$10,25.10^{-3}$	163	$0,62.10^{-4}$
81,5	$1,2.10^{-2}$	$11,30.10^{-3}$	171	$0,66.10^{-4}$
111,0	$0,9.10^{-2}$	$12,40.10^{-3}$	145	$1,10.10^{-4}$
38,5	$2,5.10^{-2}$	$5,57.10^{-3}$	46	$1,28.10^{-4}$

TABLEAU II-1

1.2. Intensité respiratoire d'oeufs

Un lot de 10 kystes est extrait dans les mêmes conditions que précédemment. Après un traitement au New Blue R, chaque kyste est disséqué dans une solution de NaCl 0,3 M pour empêcher les éclosions. Un lot d'oeufs vivants,

dénombré, est pris par kyste et placé dans un ludion à bouchon intérieur (voir Ch. 1, 2.1.3) en suspension dans la solution saline. Les oeufs sont récupérés et recomptés après la mesure. Le tableau II-2 donne les résultats des mesures pour ces dix kystes : la moyenne d'intensités respiratoires par oeuf (colonne de droite) est de $0,17.10^{-4}$ et l'écart type de $0,05.10^{-4}$.

H_1-H_2	Erreur relative	QO_2/lot $\mu\text{l O}_2/\text{h}$	n	QO_2/oeuf $\mu\text{l O}_2/\text{h}$
92,0	$2,2.10^{-2}$	$9,30.10^{-4}$	88	$0,10.10^{-4}$
61,0	$3,3.10^{-2}$	$5,45.10^{-4}$	45	$0,12.10^{-4}$
74,0	$2,7.10^{-2}$	$6,65.10^{-4}$	50	$0,13.10^{-4}$
85,0	$2,4.10^{-2}$	$6,95.10^{-4}$	48	$0,14.10^{-4}$
95,0	$2,1.10^{-2}$	$7,35.10^{-4}$	46	$0,16.10^{-4}$
97,0	$2,1.10^{-2}$	$8,45.10^{-4}$	46	$0,18.10^{-4}$
73,0	$2,7.10^{-2}$	$7,40.10^{-4}$	40	$0,18.10^{-4}$
33,0	$6,0.10^{-2}$	$4,45.10^{-4}$	21	$0,21.10^{-4}$
120,0	$1,6.10^{-2}$	$16,65.10^{-4}$	75	$0,22.10^{-4}$
110,0	$1,8.10^{-2}$	$12,70.10^{-4}$	47	$0,27.10^{-4}$

TABLEAU II-2

1.3. Intensité respiratoire de larves

Les larves étudiées sont obtenues à partir d'une suspension de larves stérilisées (voir Ière partie, 2.3.2.). Les mesures sont faites dans des ludions à bouchon intérieur contenant de 20 à 30 larves en suspension dans l'eau. Les relevés de pression d'équilibre ne sont pas linéaires : l'intensité respiratoire décroît au cours de la mesure. Un fort pourcentage des larves de chaque lot s'immobilise au cours de la mesure. Après leur sortie du ludion, les larves reprennent leur activité en moins d'une heure. La moyenne de 10 mesures est de $1,1.10^{-4}$ μl par heure et par larve pour un écart type de $0,9.10^{-4}$. Les valeurs extrêmes sont $0,7.10^{-4}$ et $1,7.10^{-4}$ $\mu\text{l O}_2/\text{h}$.

2. DISCUSSION

2.1. Variabilité des résultats pour une même catégorie

Dans chacune des catégories étudiées (kystes, oeufs et larves), le rapport des valeurs extrêmes est compris entre 2,5 et 3. On peut exclure les kystes dont le contenu hétérogène (oeufs et larves) rend toute appréciation

difficile et ne considérer que les oeufs et les larves. Ces résultats permettent deux hypothèses :

1. Il existe des différences physiologiques parmi les éléments d'un même stade (larves ou oeufs).

Ces différences peuvent tenir à une variabilité individuelle qui peut provenir de trois origines :

- *Génétique* : On ne connaît pas le degré d'hétérogénéité génétique de la souche utilisée. On peut donc envisager d'observer si l'établissement de lignées consanguines strictes peut conduire à une réduction de la variabilité. L'expérience prouve (communication personnelle de NETSCHER) que de telles lignées consanguines peuvent se maintenir au moins pendant cinq générations sans que leur taux de reproduction diminue.
- *Passé de l'individu considéré* : Trois facteurs paraissent a priori importants. Tout d'abord, la variabilité de l'âge des kystes étudiés, d'autant plus importante dans ce cas, puisque l'inoculation a été faite par une masse d'oeufs (voir ch. 1, 2.1.). Ensuite, l'ordre de ponte peut déterminer une variation qualitative continue liée au vieillissement de la femelle. Enfin, la position d'un oeuf, périphérique ou centrale, par rapport au groupe d'oeufs, peut l'exposer à des conditions particulières d'oxygénation (ONIONS, 1955), ou de concentrations de facteurs divers. L'effet de ces conditions particulières pourrait modifier le métabolisme de l'oeuf de façon durable.
- *Conditions de mesure* : On sait que l'intensité respiratoire de certaines espèces de nématodes est liée à la pression partielle d'oxygène (BAIR, 1955), ou à la concentration de gaz carbonique (ROHDE, 1960). Il existe des limites de concentration, en dehors desquelles pour le gaz carbonique, et en dessous desquelles pour l'oxygène, l'intensité respiratoire baisse considérablement. Les valeurs exactes de ces limites varient vraisemblablement d'un individu à l'autre. Dans la mesure où les conditions qui existent dans la cellule de mesure sont voisines de ces valeurs, cela peut conduire à une variabilité très importante de l'intensité respiratoire. Le gaz carbonique est, en principe, à une concentration nulle à cause de la présence de soude. L'oxygène dans la bulle gazeuse atteint en fin de mesure une concentration inférieure de 7 % à celle de l'air normal ; d'après les résultats de BAIR (1955) et de NIELSEN (1949), cette baisse est assez éloignée des valeurs critiques. Par contre, il peut exister dans le ludion, comme on l'observe dans certains autres respiromètres (UMBREIT & al., 1959), un phénomène de diffusion limite. Ce phénomène, dû à l'épaisseur d'eau qui sépare les animaux de la bulle d'air (figure 27 A), réduit l'oxygène disponible à leur niveau. L'utilisation d'un ludion renversé (figure 27 B), où la distance de diffusion est réduite au minimum, ou bien la

garniture du ludion à l'aide d'oxygène pur, permettrait d'apporter une solution à ce problème.

Ces différences peuvent également tenir à une évolution des oeufs et des larves qui passeraient par des étapes successives. La mesure de l'intensité respiratoire à l'échelon individuel de l'oeuf ou de la larve paraît pour l'instant exclue pour des raisons de sensibilité de la technique. Il serait donc nécessaire de trouver un critère distinct (morphologie, densité, etc ...) qui permette de réunir le nombre d'éléments nécessaires pour caractériser les paramètres respirométriques de ces étapes.

2. La variabilité est d'ordre instrumental. Comme nous l'avons vu précédemment (ch. 1, 3), cette éventualité ne paraît pas pouvoir être retenue.

2.2. Mesure de l'intensité respiratoire d'oeufs

Les lots d'oeufs sont maintenus dans une solution qui inhibe l'éclosion. Il n'est pas exclu que cette inhibition corresponde à une modification de l'intensité respiratoire, dont il serait nécessaire de pouvoir apprécier la portée. Or, quand les oeufs sont maintenus en suspension dans l'eau, des éclosions se produisent et le relevé des pressions d'équilibre du ludion est irrégulier et inexploitable. Dans la mesure où le prélèvement des oeufs pour une mesure parmi la population d'oeufs d'un kyste continue à être fait au hasard, on est donc conduit à une impossibilité. La solution consiste, là encore, à trouver un critère qui permette de sélectionner des oeufs qui n'éclorent pas au cours de la mesure. Cette sélection correspondrait en fait à la classification établie par SHEPHERD (1962 a), vue précédemment et qui, pour l'instant, reste théorique.

2.3. Comparaison des intensités respiratoires de kystes et d'oeufs

Ces mesures sont largement comparables sur le plan physiologique, sauf éventuellement en ce qui concerne la limitation d'oxygène dans le kyste due à la diffusion. Si l'on admet pour une larve une valeur moyenne de l'intensité respiratoire de $1,1 \cdot 10^{-4}$ et pour un kyste une valeur de l'intensité respiratoire de $0,7 \cdot 10^{-4}$, on a, avec 5 % de larves pour un kyste contenant 100 éléments (pourcentage observé en moyenne), $0,7 = (95 \cdot \text{I.R. oeuf} + 5 \cdot 1,1) / 100$, soit $0,67 \cdot 10^{-4}$ μl par oeuf. Cette valeur est très supérieure à celle obtenue pour les lots d'oeufs ($0,17 \cdot 10^{-4}$). Il apparaît donc que la respiration des oeufs dans le kyste est supérieure à celle des oeufs dans la solution hypertonique. Il est à nouveau impossible de décider si ce résultat tient aux propriétés des oeufs ou à l'action du NaCl.

De toutes façons, il apparaît que la respiration des oeufs dans le kyste est inférieure de moitié, ou peut-être davantage, à celle d'une larve. Ce fait confirme l'existence d'une activation métabolique que subit une larve lors de son éclosion.

CONCLUSIONS GENERALES DE LA IIème PARTIE

1. TECHNIQUE DU LUDION

L'utilisation d'un modèle original de ludion, le ludion à bouchon extérieur, se révèle adaptée à la mesure de l'intensité respiratoire de kystes. Sa fabrication, sa mise en oeuvre et son comportement en font un instrument de routine. Ses possibilités peuvent être utilisées pour l'étude d'autres espèces ou d'autres formes.

Les difficultés rencontrées avec un modèle plus sensible révèlent que la méthode employée est proche de ses limites. Il paraît, en particulier, exclu d'envisager la mesure individuelle d'oeufs ou de larves.

2. MESURES D'INTENSITE RESPIRATOIRE

Malgré leur caractère relativement préliminaire, les mesures confirment que l'intensité respiratoire moyenne d'une larve active est au moins deux fois plus importante, sinon plus, que l'intensité respiratoire moyenne des oeufs dans un kyste. L'éclosion correspond donc à une activation du métabolisme de la larve II. Ce résultat devra être complété ultérieurement par l'étude de l'évolution de l'intensité respiratoire du kyste. Les conditions requises pour cette étude, qui représente le but à long terme du travail entrepris, sont désormais réunies.

La variabilité des résultats obtenus implique une hétérogénéité physiologique du contenu en oeufs du kyste. Son analyse reste subordonnée à l'établissement de critères qui permettraient de différencier des catégories équivalentes dans la population d'oeufs du kyste.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- AIMI, R. 1960. Cell physiological study on the function of the root. IV. Active oxygen supply into the root from leaves in rice plant. *Proc. Crop. Sci. Soc. Japan*, 29, 51-54.
- ANGLADETTE, A., 1966. *Le riz*. 1 vol. 930 pp. MAISONNEUVE et LAROSE, editeurs, Paris.
- BAIR, T.D., 1955. The oxygen consumption of *Rhabditis strongyloides* and other nematodes related to oxygen tension. *J. Parasitol.*, 41, 613-623.
- BERDON-BRIZUELA, R. et MERNY, G., 1964. Biologie d'*Heterodera oryzae* Luc et Berdon, 1961. I. Cycle du parasite et réactions histologiques de l'hôte. *Rev. Path. Veg. Entom. agric. Fr.*, 43, 43-53.
- BOELL, E.J., 1960. The cartesian diver technique in respirometry and enzyme assay. In : *Nematology fundamentals and recent advances*. SASSER, J.N. & JENKINS, W.R., editors. The University of North Carolina Press, Chapel Hill, U.S.A., 109-121.
- CONTREIRAS, J.C., DA SILVA, J.V., BAPTISTA, J.E., D'ARRIAGA E CUNHA, J.M. & DIAS, M.A.R., 1959. Estudos de nutrição mineral e economica de acqua relativos a Sao Tomé, efectuados e projectados pelo Grupo de Fisiologia Vegetal e Radioisotopos das Brigadas de Estudos Agronomicos do Ultramar. *Garcia de Orta*, 7 (4), 821-849.
- CUNNINGHAM, P.C., 1960. An investigation of winter dormancy in *Heterodera rostochiensis*. *Sci. Proc. R. Dublin Soc.*, Série B, 1, 1-4.
- DONCASTER, C.C. & SHEPHERD, A.M., 1967. The behaviour of second stage *Heterodera rostochiensis* larvae leading to their emergence from the egg (short communication). *Nematologica*, 13, 476-478.

- DROPKIN, V.H., SMITH Jr, W.L. & MYERS, R.F., 1960. Effect of osmotic concentration on hatching of some plant parasitic nematodes. *Nematologica*, 5, 115-126.
- ELLENBY, C., 1946. Nature of the cyst wall of the potato-root eelworm *Heterodera rostochiensis* Wollenweber, and its permeability to water. *Nature*, London, 157, 302-303.
- FENWICK, D.W., & WIDDOWSON, E., 1959. The emergence of larvae from free eggs of the potato-root eelworm *Heterodera rostochiensis* Woll. *Ann. Appl. biol.*, 47, 140-149.
- FOURCHE, J., 1957. *Etude de la consommation d'oxygène dans les oeufs de drosophile durant leur première heure de développement*. D.E.S. Laboratoire de Zoologie expérimentale, Faculté des Sciences de Lyon, 1 vol. dactylographié, 167 pp..
- FUJIWARA, A., & OJIMA, K., 1954. Physiological studies of plant roots. I. Influence of some environmental conditions on the growth of isolated roots of rice plant and wheat. *Tohoku J. Agric. Research*, 5, 53-61.
- GUIRAN, G. de, 1966. Coloration des nématodes dans les tissus végétaux par le bleu coton à froid. *Nematologica*, 12, 646.
- HOLTER, H. & ZEUTHEN, E., 1966. Manometric techniques for single cells. In : *Physical techniques in biological research*. POLLISTER, A.N., edit., Academic Press, vol. III A, 251-317.
- LANG, A., 1965. Effects of some internal and external conditions on seed germination. In : *Encyclopedia of Plant Physiology*, 15/2, SPRINGER VERLAG, Berlin, 848-893.
- LEE, D.L., 1965. *The physiology of nematodes*. OLIVER & BOYD, London, edit., 1 vol., 154 pp.
- LINDERSTROM-LANG, K., & HOLTER, H., 1942. Diffusion of gases through protective seals of oil or flottation medium in the cartesian diver. *Compt. Rend. trav. Lab. Carlsberg Ser. Chim.*, 24, 105-138.

- LOEWENBERG, J.R., SULLIVAN, T., & SCHUSTER, M.L., 1959. A virus disease of *Meloidogyne incognita incognita*, the southern root knot nematode. *Nature*, London, 184, 1896.
- LUC, M., & BERDON-BRIZUELA, R., 1961. *Heterodera oryzae*, n. sp. (Nematoda : Tylenchoidea) parasite du riz en Côte d'Ivoire. *Nematologica*, 6, 272-279.
- MAC RAE, I.C. & CASTRO T.F., 1967. Root exsudate of the rice plant in relation to akagare, a physiological disorder of rice plant. *Plant soil*, 26, 317-323.
- MERNY, G., 1966 a. Biologie d'*Heterodera oryzae* Luc et Berdon 1961. II. Rôle des masses d'oeufs dans la dynamique des populations et la conservation de l'espèce. *Ann. Epiphyties*, 17, 445-449.
- MERNY, G., 1966 b. *Les nématodes parasites du riz irrigué en Côte d'Ivoire*. (rapport préliminaire). Multigraphié 94 pp. Centre ORSTOM d'Adiopodoumé, Abidjan.
- MERNY, G., 1970. *Les nématodes parasites des rizières inondées de Côte d'Ivoire*. Thèse de doctorat d'Etat, Faculté des Sciences d'Abidjan, 1 vol., 167 pp.
- NETSCHER, C., 1969. L'ovogenèse et la reproduction chez *Heterodera oryzae* et *H. saccharii* (Nematoda : Heteroderidae). *Nematologica*, 15, 10-14.
- NIELSEN, C.O., 1949. Studies on the soil microfauna. II. The soil inhabiting nematodes. *Nat. Jutland.*, 2, 1-131.
- NIGON, V., & FOURCHE J., 1958. La précision des mesures respirométriques réalisées à l'aide du ludion. *Bull. biol. France et Belg.*, 17, 36-54.
- ONIONS, T.G., 1955. The distribution of hatching within the cyst of the potato-root eelworm, *Heterodera rostochiensis*. *Quart. J. micr. Sci.*, 96, 495-513.
- OOSTENBRINK, M., 1960. Estimating nematode populations by some selected methods. In : *Nematology fundamentals and recent advances*. SASSER, J.N. & JENKINS, W.R., editors. The University of North Carolina Press, Chapel Hill, U.S.A., 85-102.

- PITCHER, R.S., PATRICK, Z.A. & MOUNTAIN, W.B., 1960. Studies on the host parasite relation of *Pratylenchus penetrans* Cobb. to apple seedlings :
I. Pathogenecity under sterile conditions. *Nematologica*, 5, 309-314.
- REVERSAT, G., & MERNY, G., Quelques facteurs influençant la pénétration d'*Heterodera oryzae* dans les racines de riz. En préparation.
- ROHDE, R.A., 1960 a. The influence of carbone dioxyde on respiration of certain plant parasitic nematodes. *Proc. Helm. Soc. Wash.*, 27, 160-164.
- ROHDE, R.A., 1960 b. Mechanisms of resistance to plant parasitic nematodes. In : *Nematology fundamentals and recent advances*. SASSER, J.N. & JENKINS, W.R., editors. The University of North Carolina Press, Chapel Hill, U.S.A., 447-453.
- SEMBDNER, G., OSSKE, G. & SCHREIBER, K., 1961. Untersuchungen zur Atmung des Kartoffelnematoden *Heterodera rostochiensis* Wollenweber. *Biologisches Zentralblatt*, 80, 551-561.
- SHEPHERD, A.M., 1962 a. *The emergence of the larvae from cysts in the genus Heterodera*. Farnham Royal, England. Commonw. Agric. Bureau, 1 vol., 90 pp.
- SHEPHERD, A.M., 1962 b. New Blue R, a stain that differenciates between living and dead nematodes. *Nematologica*, 8, 201-208.
- TORREY, J.G., 1965. Physiological bases of organization and development in the root. In : *Encyclopedia of Plant Physiology*, 15/1, SPRINGER VERLAG, Berlin, 1256-1327.
- TOWNSHEND, J.L., 1967. Gamma irradiation of *Heterodera schachtii*. *Nematologica*, 13, 586-592.
- UMBREIT, W.W., BURRIS, R.H. & STAUFFER, J.F., 1959. *Manometric techniques*. BURGESS PUBLISHING Co, Minneapolis, U.S.A., 1 vol., 338 pp.
- WALLACE, H.R., 1963. *The biology of plant parasitic nematodes*. Edward ARNOLD (Publishers) L.D.T., London, 1 vol., 280 pp.

- WALLACE, H.R., 1966. Factor influencing the infectivity of plant parasitic nematodes. *Proc. Roy. Soc., Série B*, 164, 592-614.
- YOSHIDA, S., OHNISHI, Y. & KITAGISHI, K., 1959. Role of silicone in rice nutrition. *Soil & plant food*, 5 (3), 127-133.
- ZEUTHEN, E., 1950. Cartesian diver respirometer. *Biol. Bull.*, 98, 139-143.

P L A N C H E S

E T

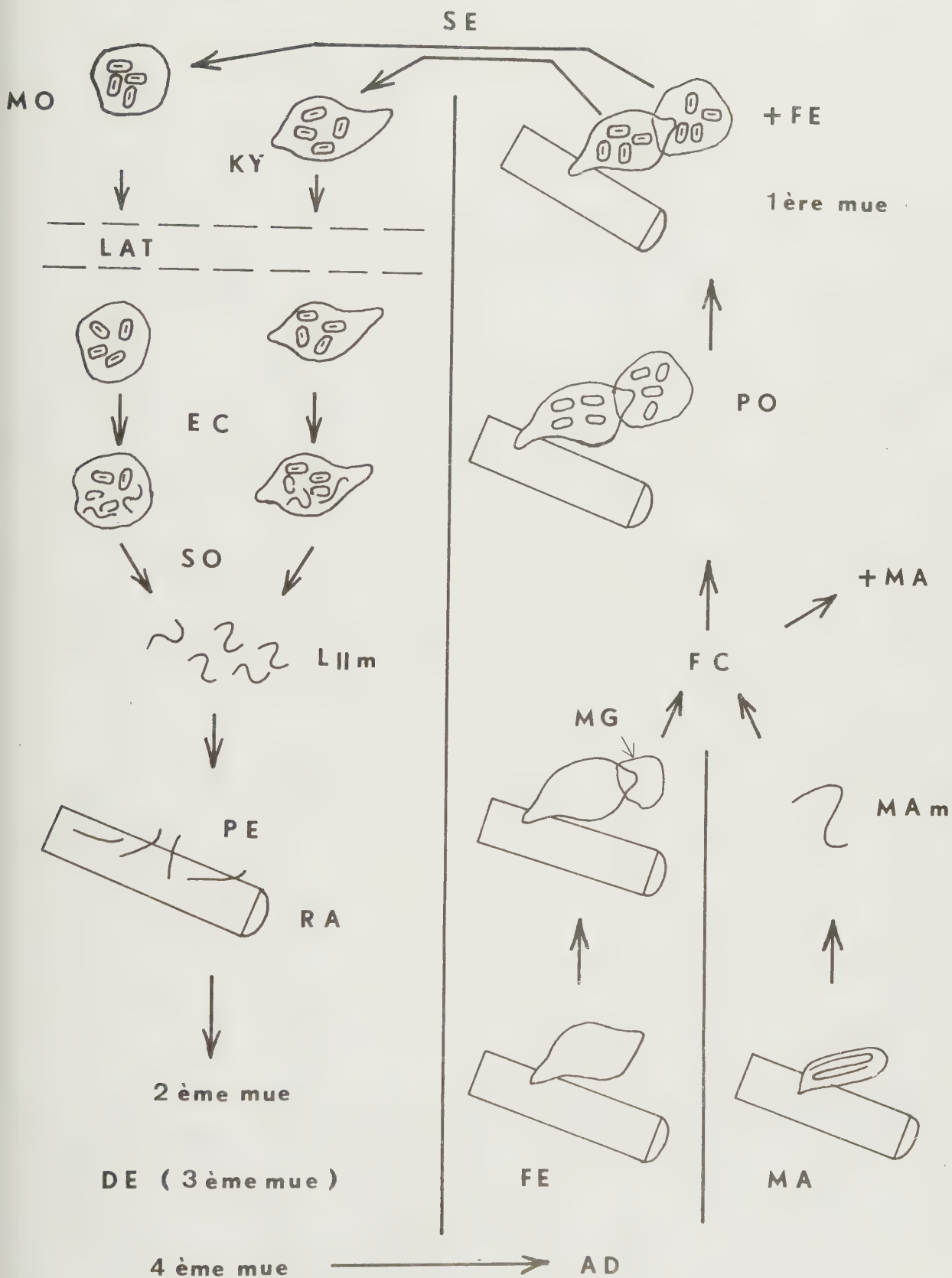
F I G U R E S

H O R S - T E X T E

PLANCHE 1

Cycle d'*Heterodera cryzae*

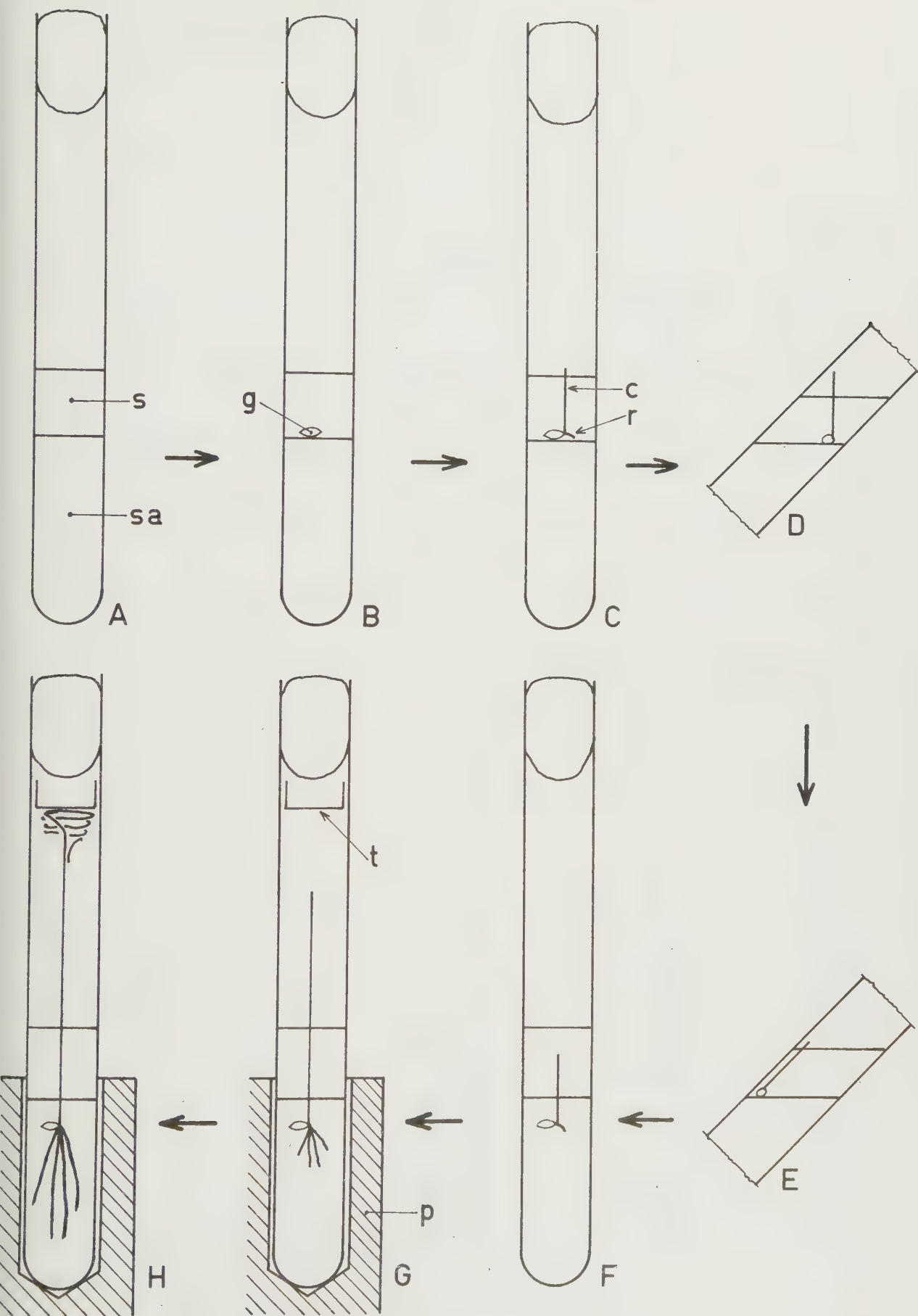
AD : adultes. DE : développement endophyte. EC : éclosion des oeufs. FC : fécondation. FE : femelle adulte (longueur moyenne : 571 μ). +FE : mort de la femelle. KY : kyste. LAT : temps de latence avant l'éclosion. LIIm : larves du second stade mobiles, infestantes (longueur moyenne : 440 μ). MA : mâle adulte. MAm : mâle adulte mobile (longueur moyenné : 820 μ). +MA : mort du mâle. MG : masse gélatineuse. MO : masse d'oeufs. PE : pénétration des larves du second stade dans les racines de l'hôte. PO : ponte. RA : racine de l'hôte (demi coupe longitudinale). SE : séparation de la masse d'oeufs et du kyste de la racine. SO : sortie des larves du second stade écloses, à partir du kyste ou de la masse d'oeufs, dans le sol.



P L A N C H E 2

Culture axénique de la plante entière de riz

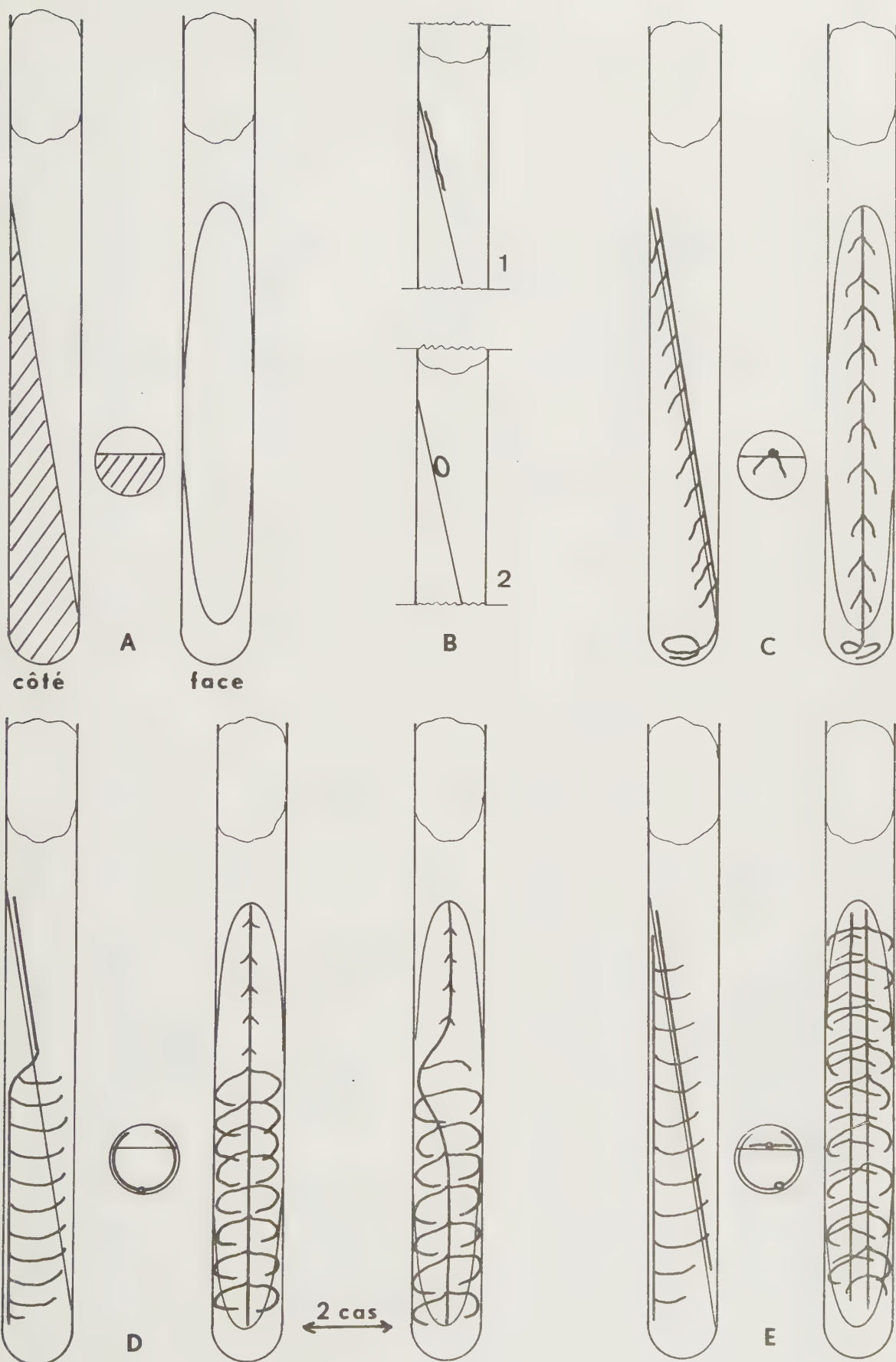
- A : Tube prêt à l'emploi (sa : sable, s : surnageant)
- B : Premier jour : mise en place de l'hôte (g : graine)
- C : Cinquième jour : graine germée (c : coléoptile, r : radicule)
- D,E,F : Cinquième jour : enfouissement de la graine
- G : Dixième jour : mise en place du tamis d'arrêt (t : tamis, p : portoir plein)
- H : Huitième semaine



P L A N C H E 3

Culture axénique de racines excisées de riz sur gélose inclinée

- A : Tube de gélose inclinée (3 vues : côté, face et coupe)
- B : Mise en place de l'hôte (B1 : explant, B2 : germination directe)
- C : Développement à partir d'un explant sur milieu normal
- D : Développement à partir d'un explant sur milieu supplémenté (2 cas)
- E : Développement à partir d'une germination directe sur milieu supplémenté (simplifié, voir également la figure 11)



P L A N C H E 4

Culture axénique de racines excisées de riz sur gélose en manchon

- A : Moule en verre en deux parties cylindriques (b : baguette, t : tube)
- B : Tube contenant le milieu et le moule
- C,D,E : Démoulage (p : pinces)
- F : Tube prêt à l'emploi
- G : Mise en place de la graine
- H : Germination sur milieu supplémenté au 5ème jour
- I : Développement sur milieu supplémenté vers le 30ème jour (simplifié, voir également la figure 12)

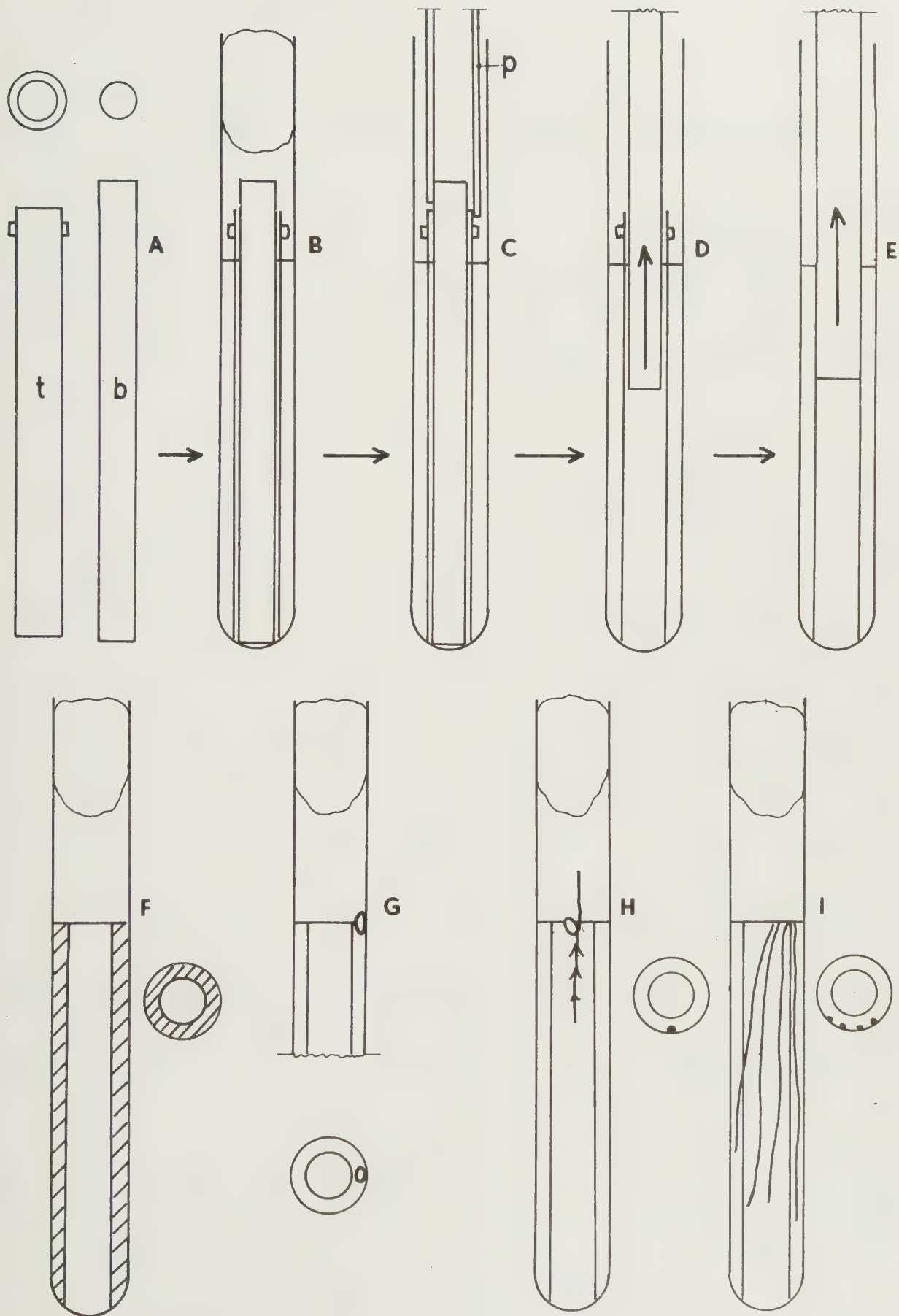


PLANCHE 5

Flottabilité d'un capillaire

A : Tronçon de capillaire cylindrique en pyrex (masse volumique D_v) en équilibre dans un liquide (masse volumique D_s).

d : diamètre interne du capillaire, en mm. e : épaisseur du capillaire, en mm. L_1 : longueur de la colonne de liquide, en mm. V_g : volume de la bulle d'air, en μl . V_v : volume de verre du tronçon de capillaire, en μl . L_g : longueur de la bulle gazeuse, en mm.

$$V_g = \pi \cdot (d/2)^2 \cdot L_g$$

$$V_v = \pi \cdot e \cdot (e+d) \cdot (L_g + L_1)$$

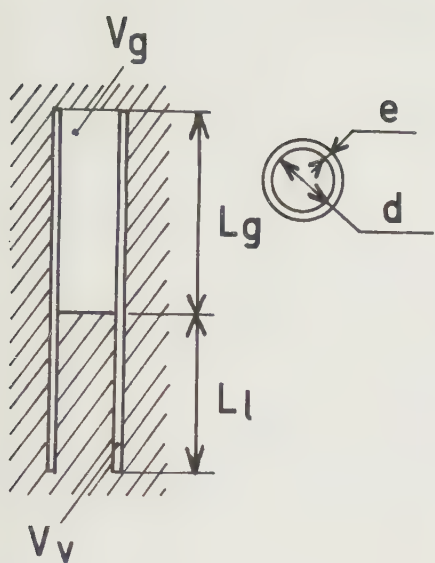
B : Dispositif de maintien d'un tronçon de capillaire pour la mesure de d et e .

C : Courbe $(L_g)_m = f(a)$ pour $L_1 = 11$ mm (en coordonnées logarithmiques, $(L_g)_m$ en mm).

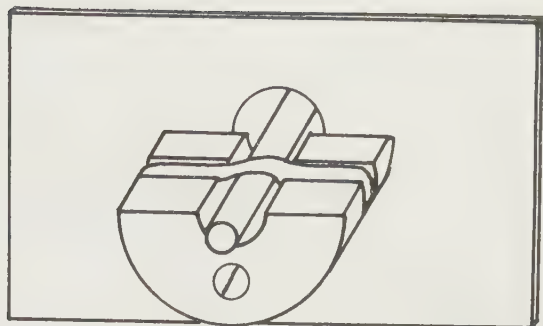
Exemple : pour $d = 1$ mm et $e = 0,08$ mm, $a = 0,08$ et $(L_g)_m = 8,3$ mm.

D : Courbes $L_g = f(d)$ pour $V_g = 2,5-5-10$ et $20 \mu\text{l}$ (en coordonnées logarithmiques, d et L_g en mm).

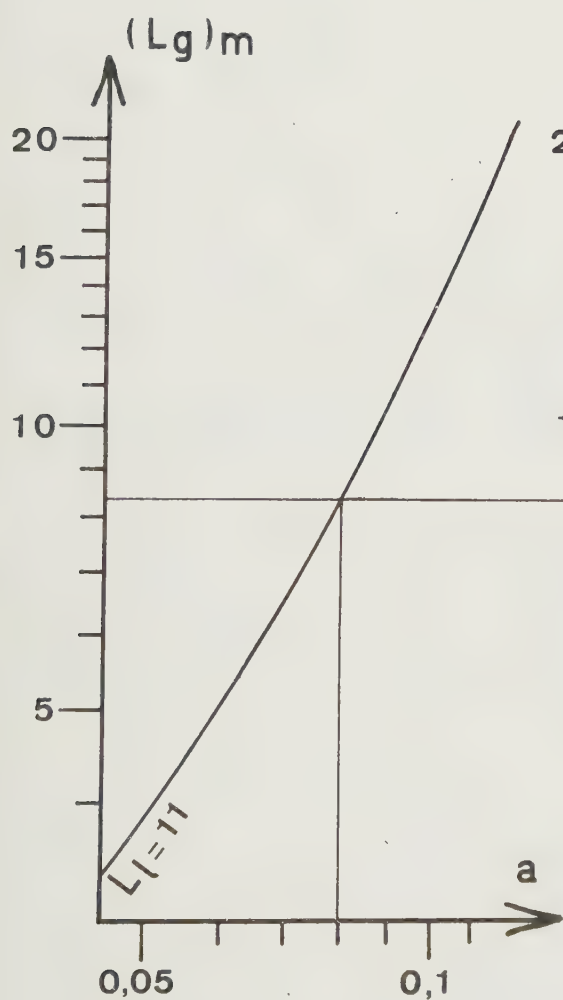
Exemple : pour $d = 1$ mm et $(L_g)_m = 8,3$ mm, $V_g = 10 \mu\text{l}$ et $L_g = 12,8$ mm.



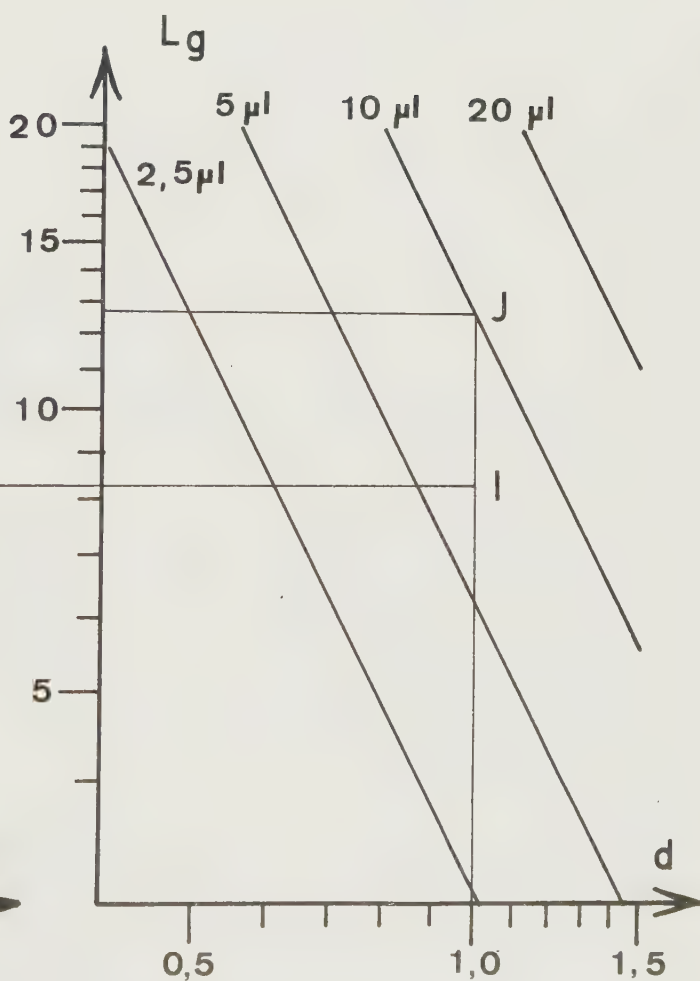
A



B



C



D

PLANCHE 6

Fabrication du ludion à bouchon extérieur

- 1 Mesure de d et de e (a : ajustement capillaire, b : bouchon, cr : chambre respiratoire, d : diamètre interne du capillaire, e : épaisseur du capillaire)
Exemple : $d = 1$ mm, $e = 0,08$ mm
- 2 Calculs. Calcul de a , $(Lg)m$, Vg , m et Lg (voir texte)
Exemple : $a = 0,08$, $(Lg)m = 8,3$ mm, $Vg = 10$ μ l et $Lg = 12,8$ mm
- 3 Marquages. A l'encre, à $Lg+4+1$ mm pour la chambre respiratoire, à 7 mm pour le bouchon.
Exemple : marquage à $12,8+4+1 = 17,8 \approx 18$ mm pour la chambre respiratoire.
- 4 Finition de la chambre respiratoire (et : étirage, ch : microchalumeau, co : coupure aux ciseaux, f : fermeture).
- 5 Coupure du bouchon (à l'aide d'un cristal de carborundum).
- 6 Ajustement de masse (m est lié à Vg par la relation 4)
 - 1ère pesée : m_1 - si $m_1 > m$, l'ajustement est éliminé
si $m_1 < m \longrightarrow$ 2ème pesée
 - 2ème pesée : m_2 Le ludion est pesé avec une baguette de la classe de masse supérieure à $(m-m_1)$
 $m_2 > m \longrightarrow$ 3ème pesée
 - 3ème pesée : la baguette est coupée par tronçons successifs jusqu'à ce que $m_3 = m$.*Exemple* : $Vg = 10$ μ l, $m = 18,17$ mg.
- 7 Mise en forme du bouchon. La baguette est soudée au bouchon.
- 8 Vérification de la masse (pesée à 0,02 mg)
Si la masse est supérieure à m , la masse de verre est limée sur toile émeri.
Si la masse est inférieure à m , un fragment de baguette est soudé, incorporé, et on est ramené au cas précédent.
- 9 Finition du bouchon. La longueur du bouchon est amenée à 5 mm.

1	
2	$a, (L_g)_m, V_g, m, L_g.$
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	

PLANCHE 7

Fabrication du ludion à bouchon intérieur

- 1 Mesure de d et de e (a_{cp} : ajustement capillaire, b : bouchon, cr : chambre respiratoire, d : diamètre interne du capillaire, e : épaisseur du capillaire)
- 2 Calculs. Calcul de a , condition $a \leq 0,1$
- 3 Marquages. A l'encre : à 26,5 pour le bouchon, à 17 mm pour la chambre respiratoire.
- 4 Finition du bouchon (ch : microchalumeau, et : étirage dans la flamme, r : repère en cire)
- 5 Préparation de la chambre respiratoire (b : baguette d'ajustement de masse de 10-15 mg, co : coupure aux ciseaux, et : étirage, s : soudure de la baguette)
- 6 Ajustement de densité (voir texte)
- 7 Mise en forme de la chambre respiratoire
- 8 Vérification de la densité (voir texte)
- 9 Finition de la chambre respiratoire
- 10 Pesée et calcul de V_g (m et V_g sont liés par la relation 5)
- 11 Fixation du repère (V_g : volume d'eau correspondant au volume calculé, m : marquage à l'encre, f : fusion du repère en cire sur une lampe à incandescence).

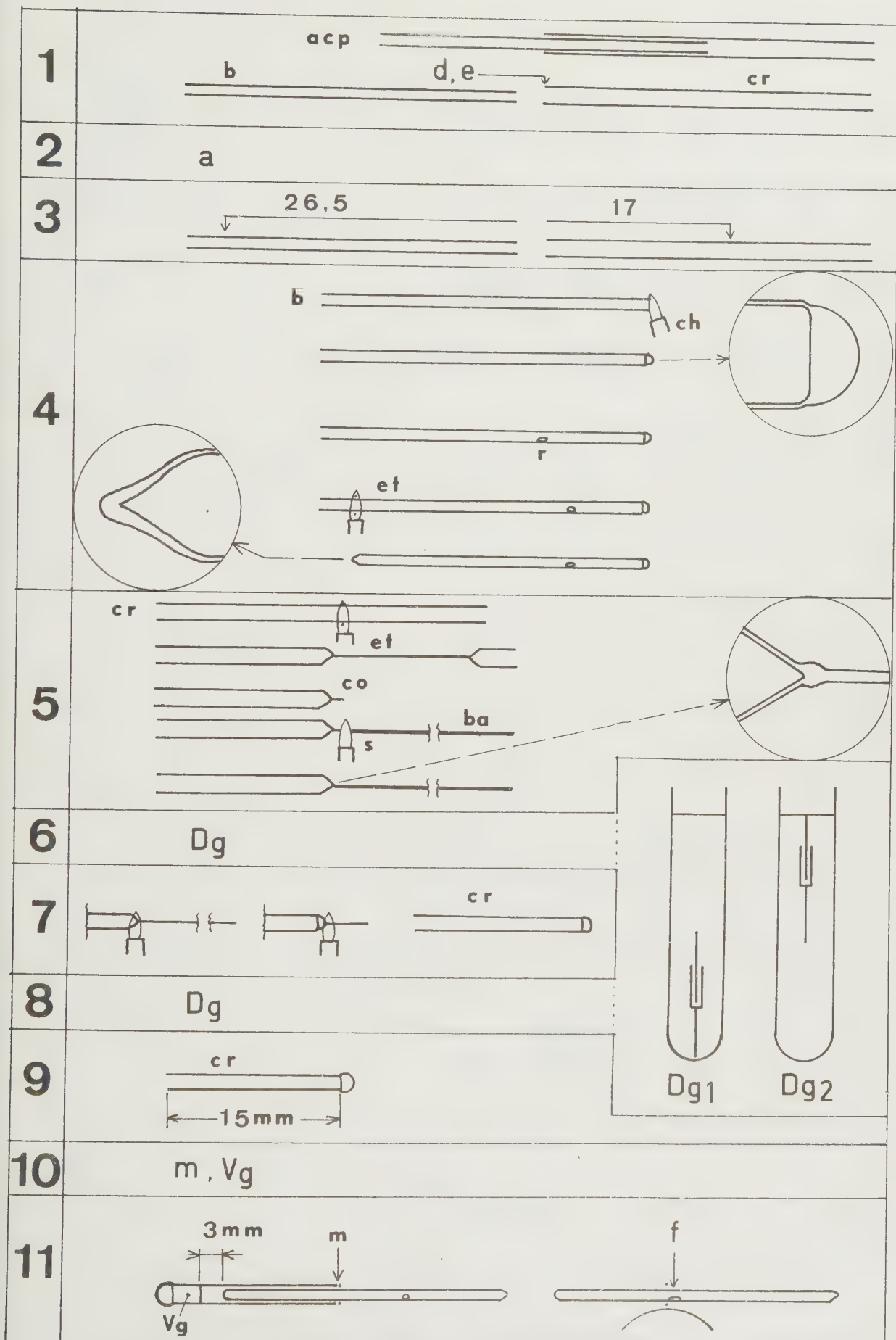
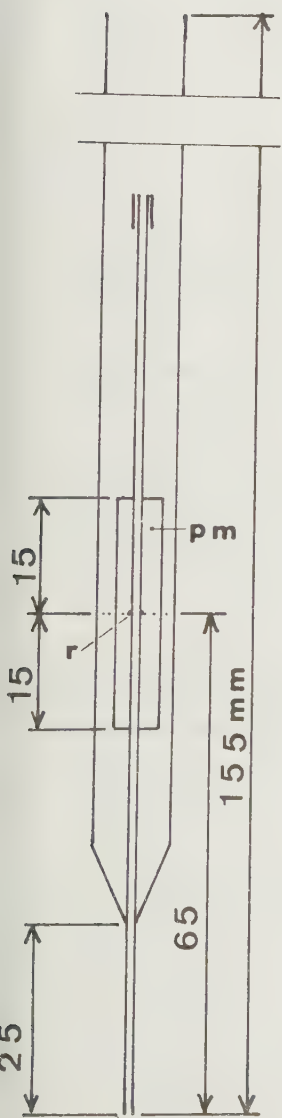
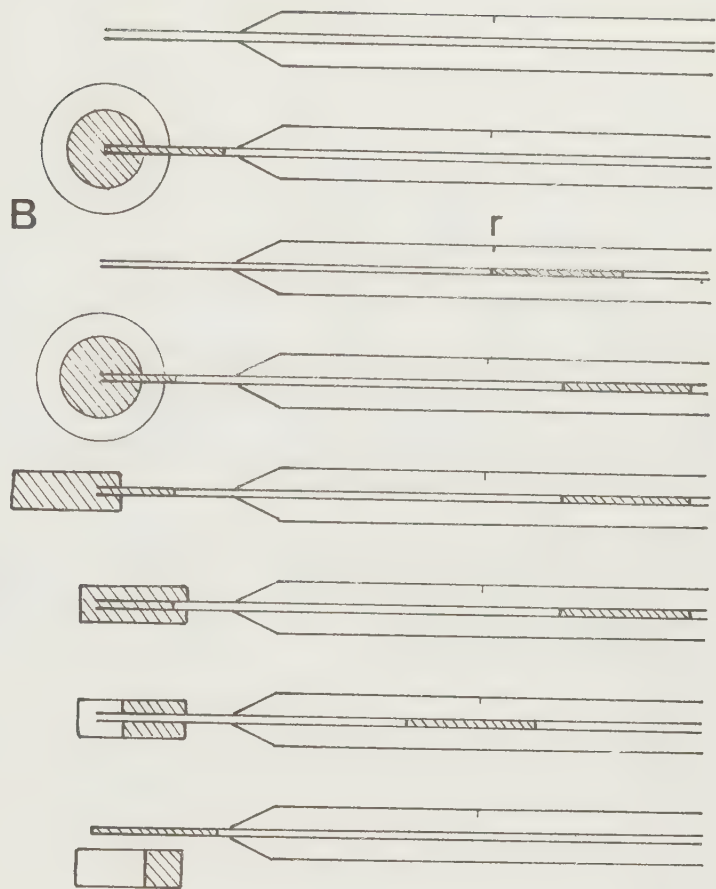
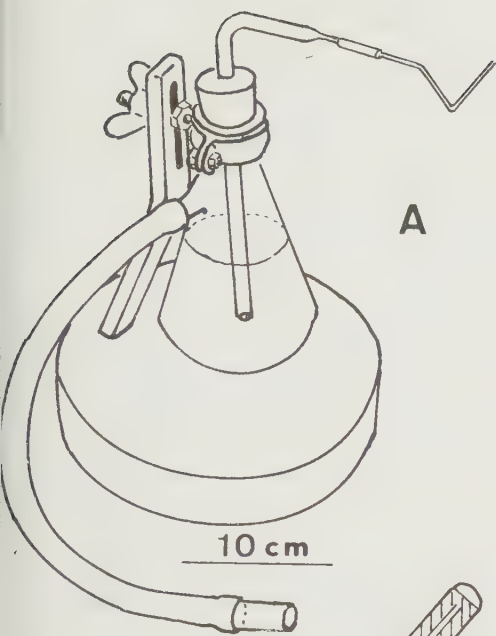


PLANCHE 8

Garniture en air de la chambre respiratoire d'un ludion

- A : Dispositif de rinçage
 - a : rinçage d'une chambre respiratoire à l'eau avant la garniture en air.
 - b : rinçage d'une chambre respiratoire à la soude après la garniture en air.
- B : Garniture en air d'une chambre respiratoire à l'aide d'une pipette (r : repère, hachuré : eau).
- C : Pipette de garniture en air (pm : papier millimétré, r : repère).
- D : Dispositif de maintien de la pipette pour la garniture en air d'une chambre respiratoire de ludion à bouchon extérieur (5 et 10 μ l).
- E : Dispositif de maintien de la pipette pour la garniture en air d'une chambre respiratoire de ludion à bouchon intérieur (1 μ l).



C

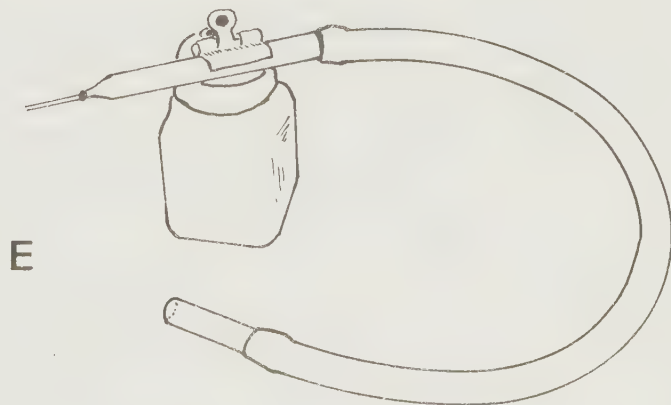
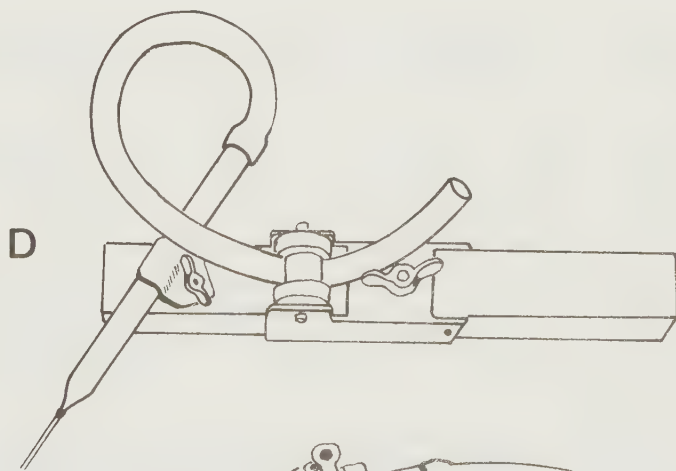


PLANCHE 9

Mise en place d'animaux en suspension dans une chambre respiratoire

A : Schéma de principe du micromanipulateur

CA : double cardan. CL : chariot longitudinal. CR : chambre respiratoire. CRE : crémaillère. CT : chariot transversal. G : gabarit. M : miroir à 45°. P : pipette avec nématodes. RO : rotule portant la pipette. TS : tube souple.

OX : axe de déplacement longitudinal (chariot longitudinal)

OY : axe de déplacement vertical (crémaillère)

OZ : axe de déplacement transversal (chariot transversal)

B : Manipulation

- Réglage initial

1. A l'aide du gabarit, rendre le capillaire de la pipette parallèle à l'axe de déplacement longitudinal en agissant sur la rotule. Puis bloquer la rotule.

2. Sous la loupe binoculaire, à l'aide du miroir à 45°, rendre la chambre respiratoire parallèle au capillaire de la pipette en agissant sur le cardan. Puis bloquer le cadran.

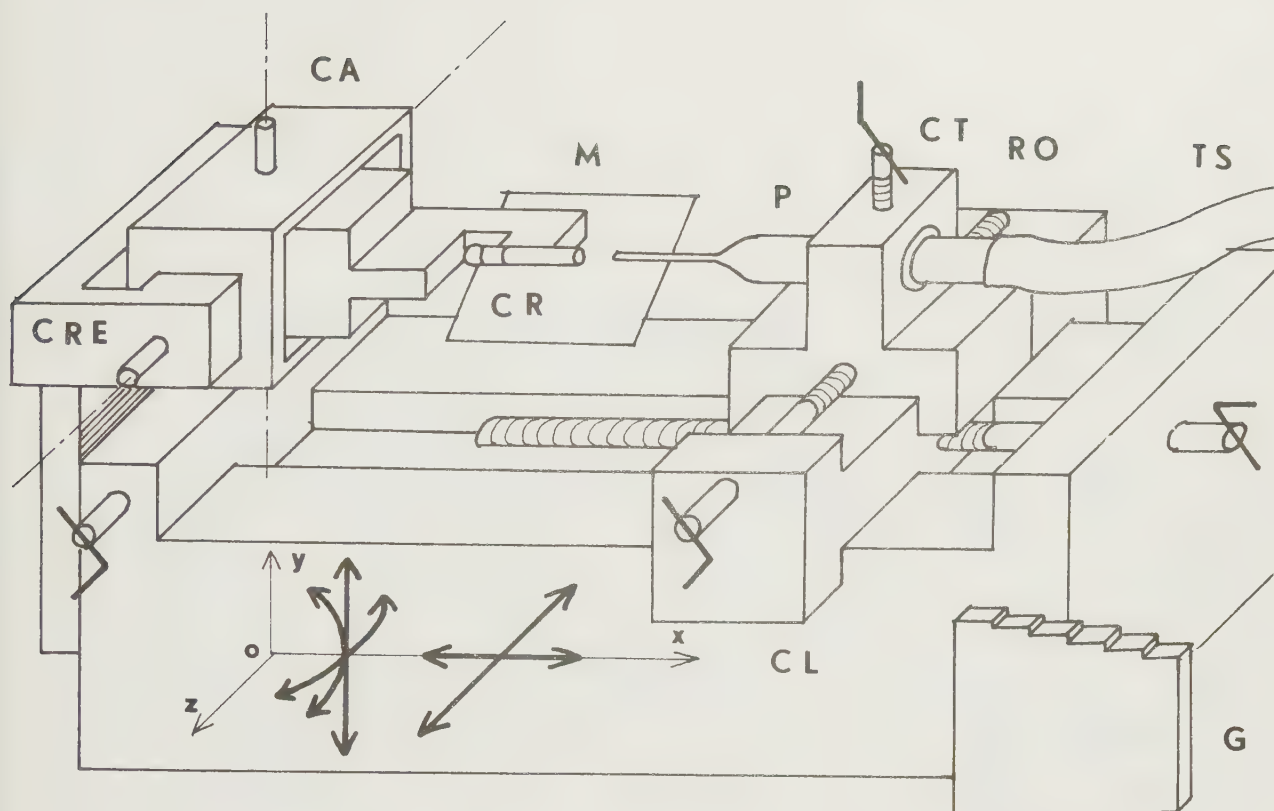
3. Sous la loupe binoculaire, à l'aide du miroir à 45°, faire coïncider les axes de la chambre respiratoire et de la pipette à l'aide du mouvement vertical (chambre respiratoire) et du mouvement transversal (pipette). Cette dernière position correspond au premier schéma du croquis B.

- Mise en place

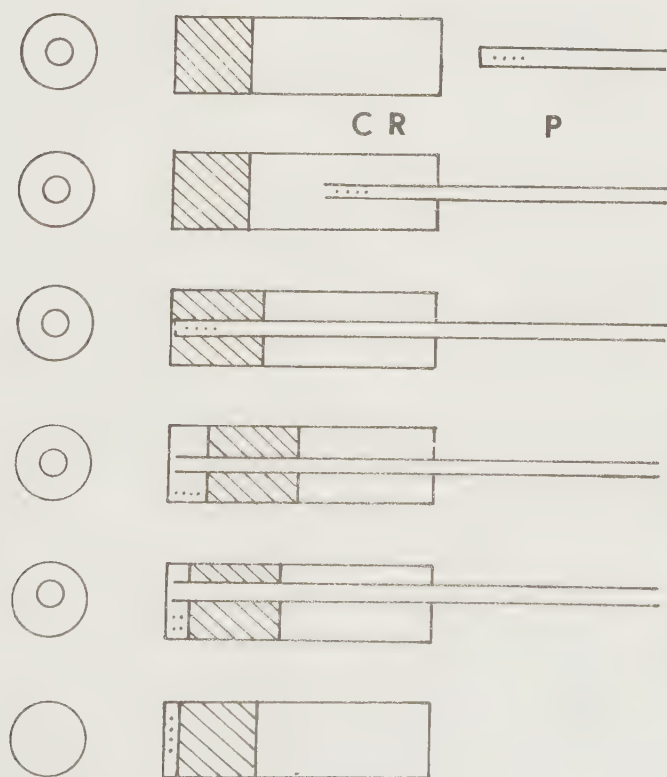
Le mouvement de la pipette se fait longitudinalement. Le déplacement de la suspension est provoqué par une pression exercée par l'intermédiaire du tube souple.

CR : chambre respiratoire contenant la bulle gazeuse (hachuré) et une colonne de solution de NaCl 0,3 M.

P : pipette contenant les oeufs en suspension dans la solution de NaCl 0,3 M.



A



B

PLANCHE 10

Vue de face de l'appareil

BO : banc d'optique. CF : couvercle fixe (en trait interrompu : emplacement du couvercle mobile, CM). CM : couvercle mobile. CP : capillaire de lecture du manomètre. CRA : coffrage du réservoir d'alcool du manomètre. CT : coffrage thermostaté. F. AV : fenêtre avant. MM : manomètre à lecture monobranche. NE : niveau d'eau de l'aquarium. FF : flacons de flottaison. R : réglet métallique de 1 mètre. R_1 et R_2 : robinets à trois voies. RP : régulateur de pression. RRP : rampe de robinets plats. TBR : tubulure reliant R_1 à la bouteille de référence (immergée dans le bain). TFF : tubulure reliant R_2 à la rampe de robinets plats. V : viseur.

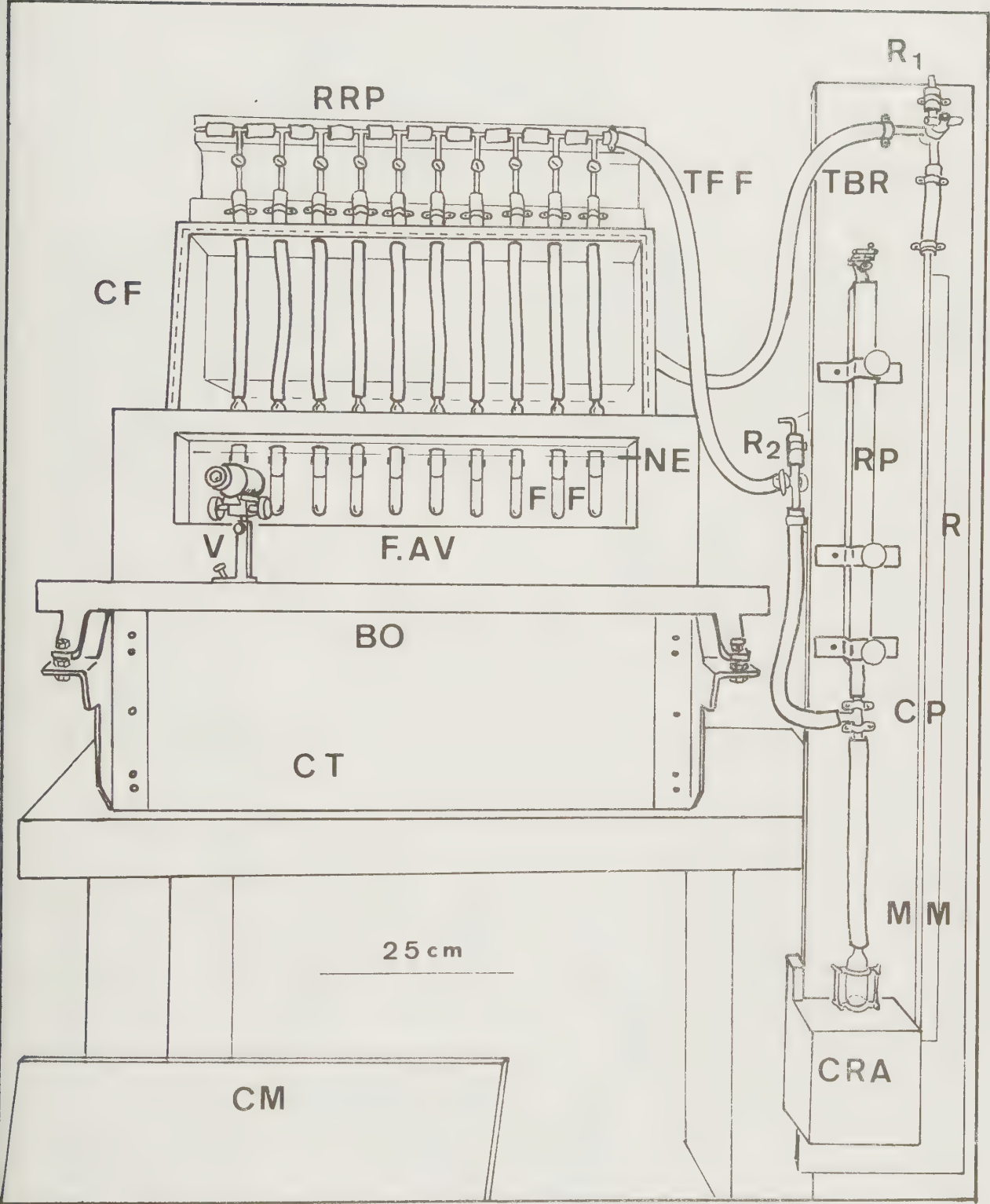


PLANCHE 10

P L A N C H E 1 1

Vue de 3/4 arrière de l'appareil

BO : banc d'optique. CT : coffrage thermostaté. E : tube fluorescent.
F. AR : fenêtre arrière. PA : pompe à aquarium (propreté du bain). RE : re-
lais. RRP : rampe de robinets plats. SO : stock de soude décinormale. TBR :
tubulure reliant R_1 à la bouteille de référence (immergée dans le bain). TC :
thermomètre à contact. TFF : tubulure reliant R_2 à la rampe de robinets plats.
U : appareil de régulation thermique.

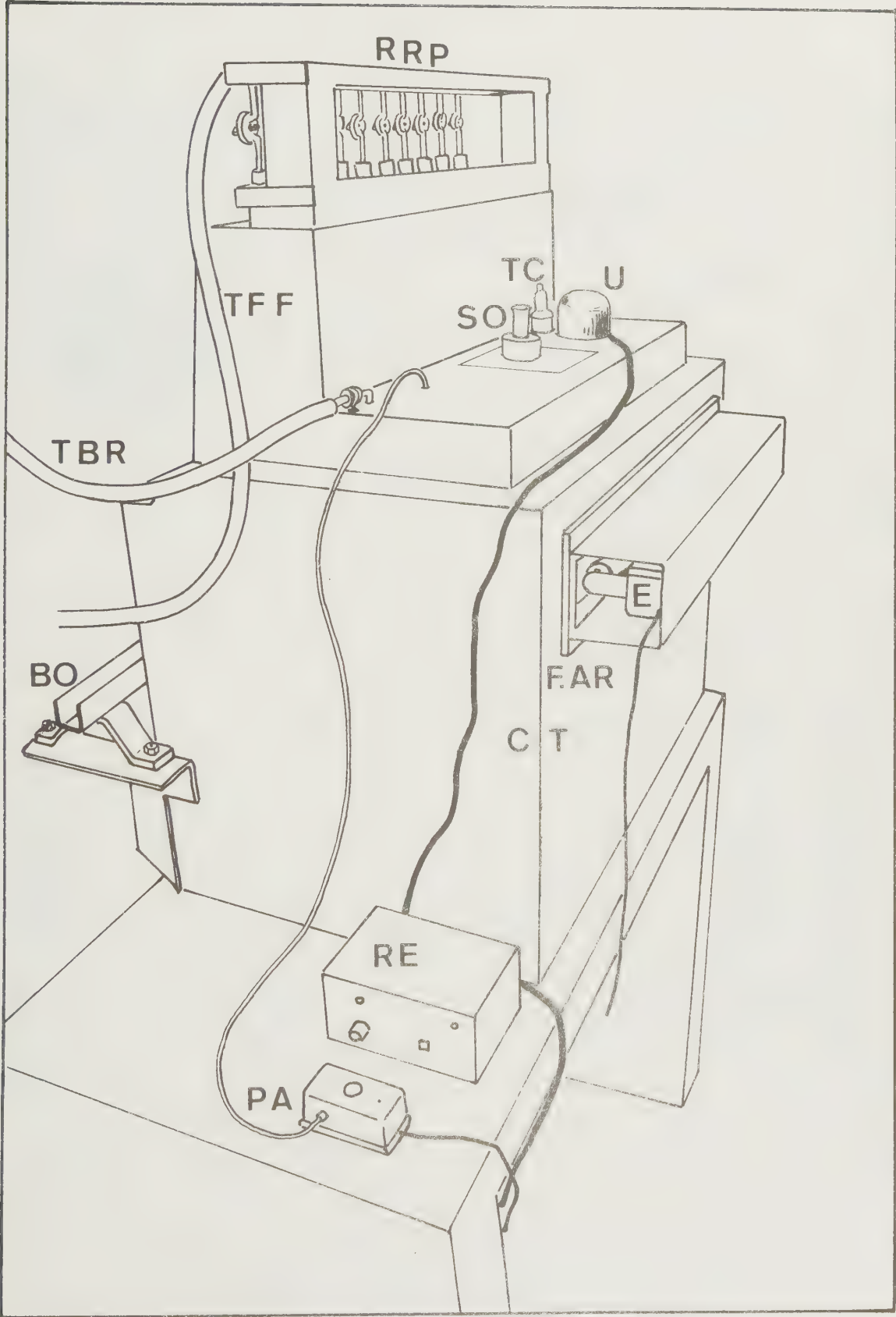


FIGURE 1 : Dispositif pour l'éclosion et la stérilisation des masses d'oeufs

La maille du tamis (250 μ) laisse passer les larves qui sédimentent (s : solution ou eau, t : tamis à maille de 250 μ , m : masse d'oeufs).

FIGURE 2 : Eclosions cumulées (N) en fonction du temps (t) de deux lots de 50 masses d'oeufs

T : dans l'eau

E : dans NaCl 0,3 M pendant 5 jours puis dans l'eau

(2 répétitions pour chaque essai, à 20 jours, la différence est significative à 0,01)

FIGURE 3 : Dispositif pour l'aération en conditions stériles d'une suspension de larves (a : air)

FIGURE 4 : Habitus des larves.

A : tuées

B : immobilisées

FIGURE 5 : Tamis d'arrêt pour les tubes de culture axénique de la plante entière de riz

A : fabrication

B : mise en place

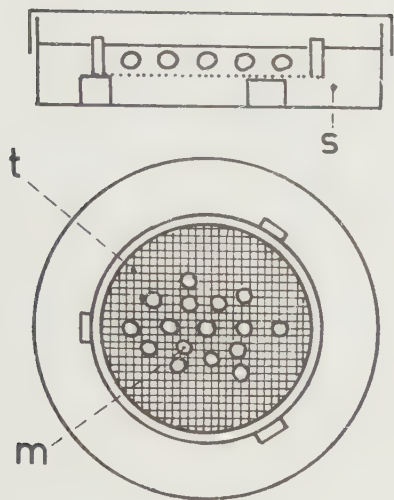


FIGURE 1

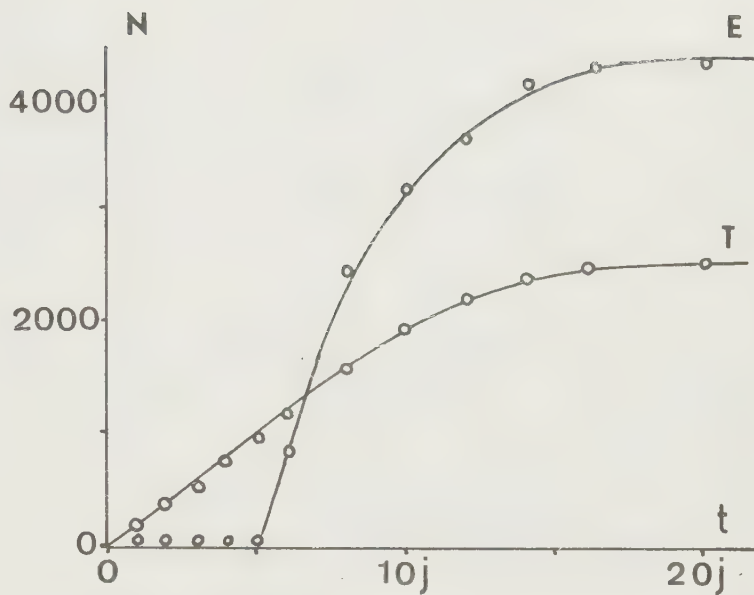


FIGURE 2

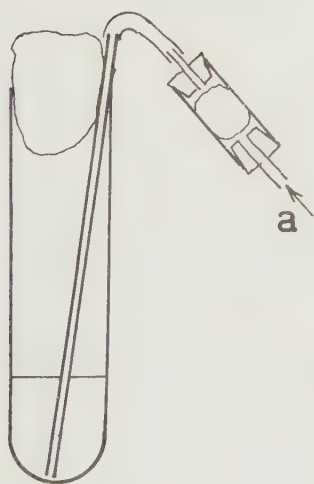


FIGURE 3



FIGURE 4

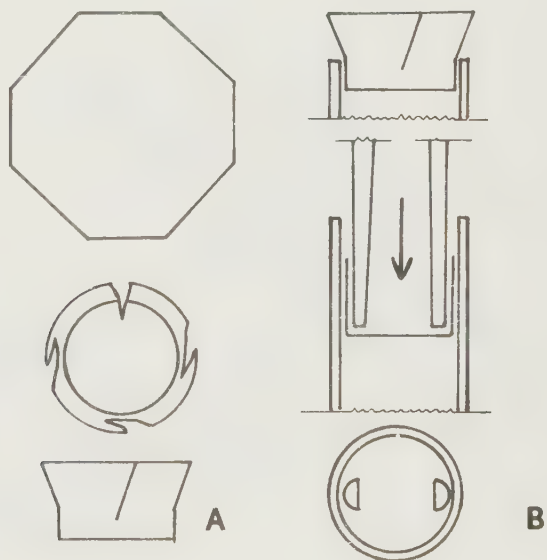


FIGURE 5

FIGURE 6 : Scalpel pour la coupure des racines dans les tubes de gélose.

FIGURE 7 : Tube à vis stérilisable, pour centrifugeuse.

A : tube

B : détail de la partie effilée après une centrifugation et l'élimination du surnageant (l : larves, m : ménisque)

FIGURE 8 : Eclosions individuelles de masses d'oeufs ($n=60$) dans l'eau après 5 jours dans NaCl 0,3 M. En abscisses, nombre de larves écloses en 3 semaines ; en ordonnées, fréquences (moyenne : 227 ; extrêmes : 39-455)

FIGURE 9 : Etalonnage du procédé d'ajustement du pH final du milieu gélosé. En abscisses : pH initial de la deuxième fraction contenant tous les éléments sauf l'agar ; en ordonnées : pH final du mélange des deux fractions après autoclavage.

FIGURE 10 : Position des racines excisées entre verre et gélose sur milieu supplémenté.

A : situations relatives de la paroi du tube (v), de la gélose (g) et de la racine (r).

B : gélose inclinée sortie du tube avec les racines partiellement dégagées.



FIGURE 6

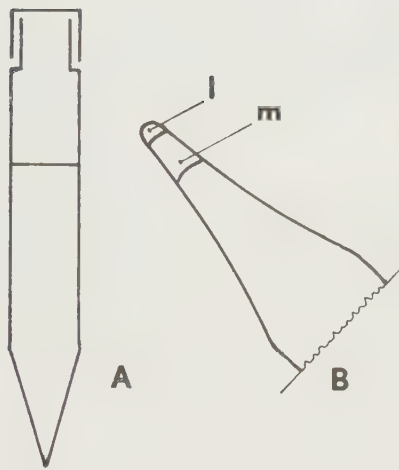


FIGURE 7

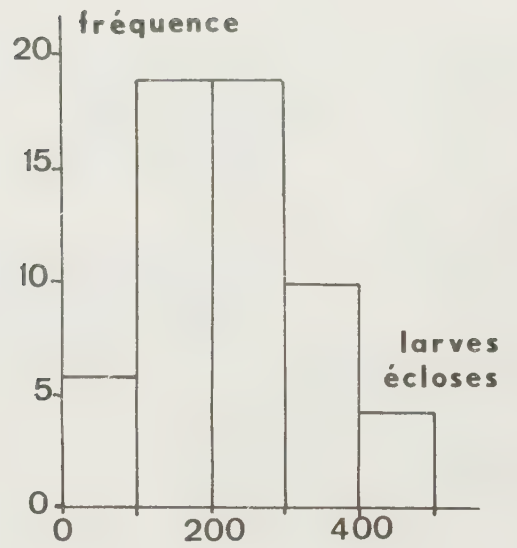


FIGURE 8

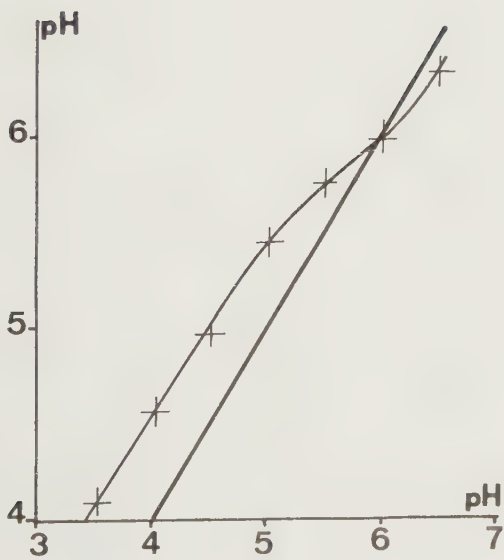


FIGURE 9

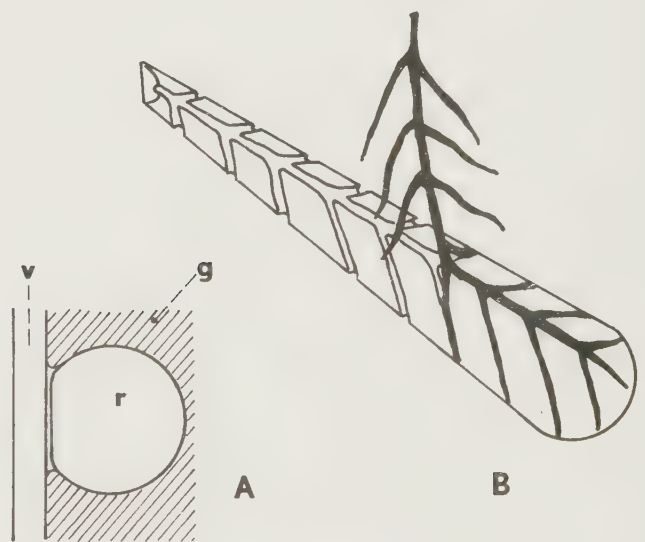


FIGURE 10

FIGURE 11 : Inoculation par masse d'oeufs (M) d'un tube de gélose inclinée (milieu supplémenté) contenant des racines obtenues par germination directe (3 vues).

FIGURE 12 : Inoculation par masse d'oeufs (M) d'un tube de gélose en manchon (milieu supplémenté) contenant des racines obtenues par germination directe (3 vues). Le trait fin au dessus de la masse d'oeufs figure la limite du film liquide qui l'enveloppe.

FIGURE 13 : Portoir en verre avec tamis en acier inoxydable pour recueillir individuellement les kystes (stérilisable).

FIGURE 14 : Pénétration (y) en fonction de l'inoculum (x) (coordonnées logarithmiques). Avec un plant de 15 jours

1 MERNY, 1966 b

2 1968

3 MERNY, 1970

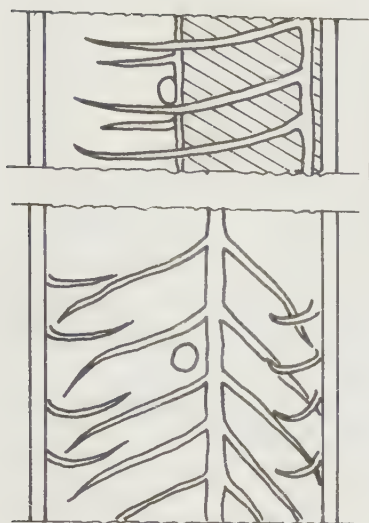


FIGURE 11

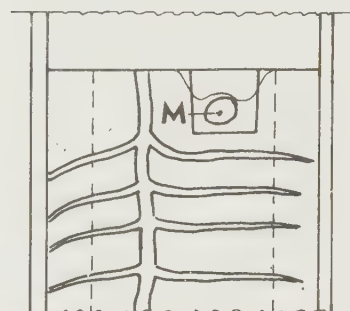
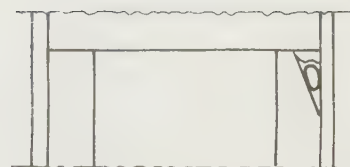
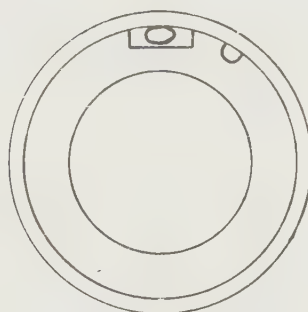
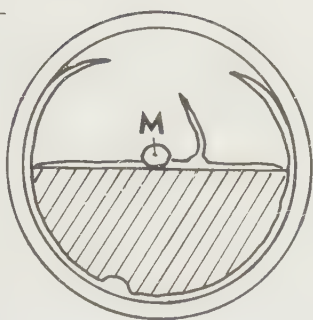


FIGURE 12

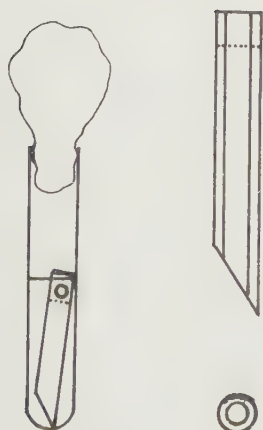


FIGURE 13

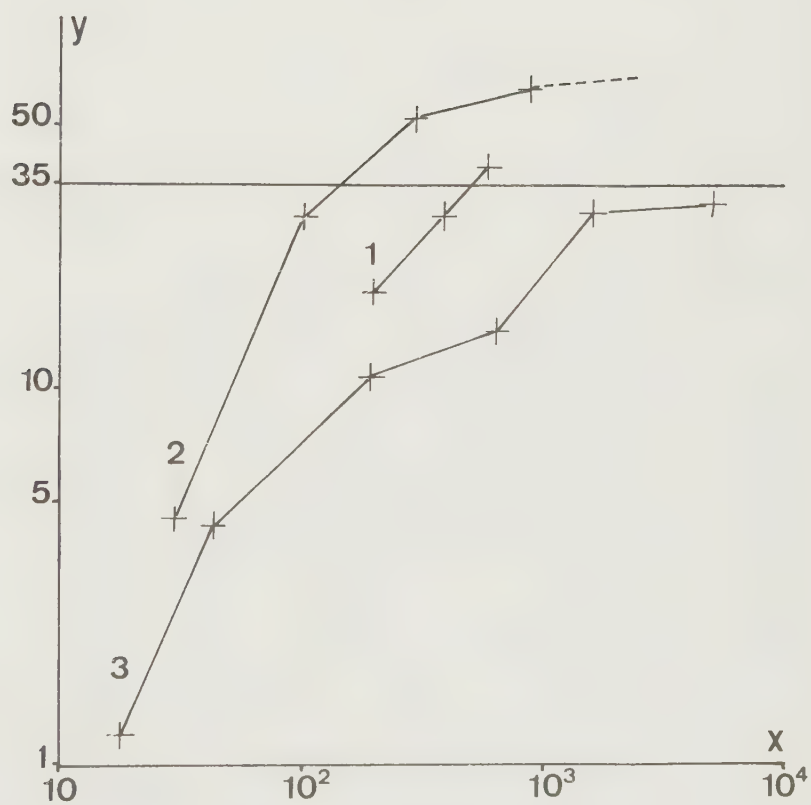


FIGURE 14

FIGURE 15 : Schéma de principe du ludion (d'après NIGON et FOURCHE, 1958)

BR : bouteille de référence. BT : bain thermostaté. F : pression hydrostatique d'équilibre (constante). FF : flacon de flottaison. H : pression manométrique d'équilibre. L : ludion simple à l'équilibre. MM : manomètre à lecture monobranche. R_1 et R_2 : robinets à trois voies. RA : réservoir d'alcool du manomètre. RP : régulateur de pression. T_a : température ambiante. T_b : température du bain thermostaté. V : viseur.

FIGURE 16 : Diffusion dans un ludion

A : Ludion simple (d'après NIGON et FOURCHE, 1958)

B : Ludion à bouchon (schéma de principe, cr : chambre respiratoire, b : bouchon, d : diamètre interne)

Ld : longueur de diffusion

Sd : section de diffusion (hachuré)

FIGURE 17 : Blocage de deux tronçons de capillaires ovalisés

FIGURE 18 : Ludion à bouchon extérieur

A : Schéma : Lcr : longueur de la chambre respiratoire, Lb : longueur du bouchon, d : diamètre interne de la chambre respiratoire (dimensions type pour un ludion de 10 μ l : d = 1 mm, Lcr = 18 mm, Lb = 5 mm)

B : Position d'équilibre dans le flacon de flottaison (hachuré : occupé par de l'air, vg : volume gazeux à l'équilibre)

FIGURE 19 : Ludion à bouchon intérieur

A : Schéma : les définitions de Lb, Lcr et d sont identiques à celles de la figure 18 A (dimensions type pour un ludion de 1 μ l : d = 1 mm, Lcr = 15 mm, Lb = 25 mm)

B : Position d'équilibre dans le flacon de flottaison (hachuré : occupé par de l'air, Va : volume d'air inclus dans le bouchon, Vg : volume gazeux à l'équilibre)

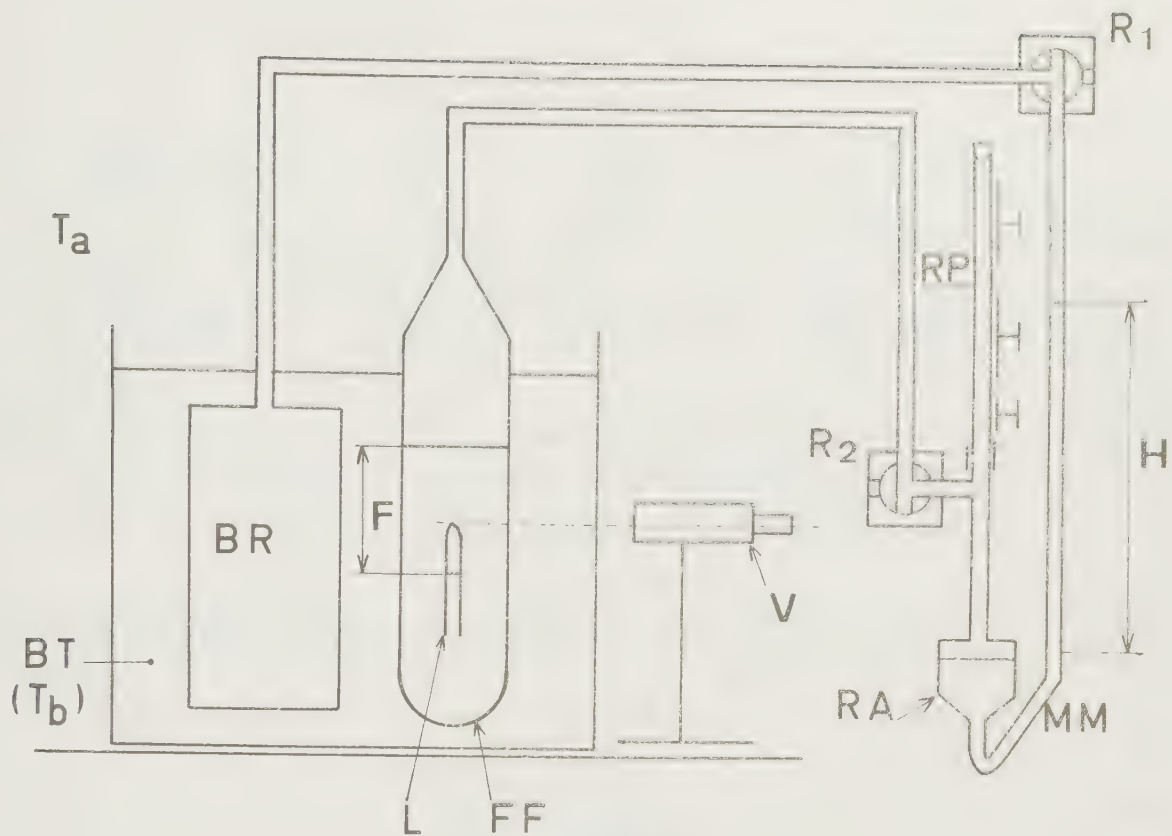


FIGURE 15

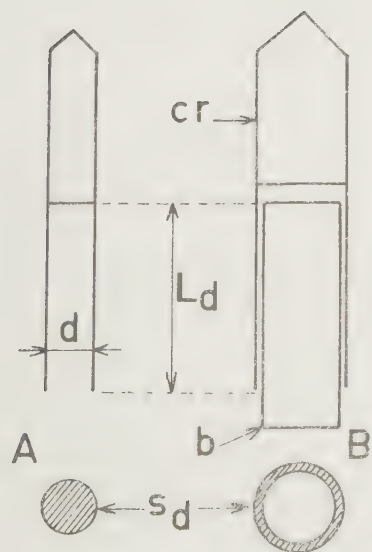


FIGURE 16



FIGURE 17

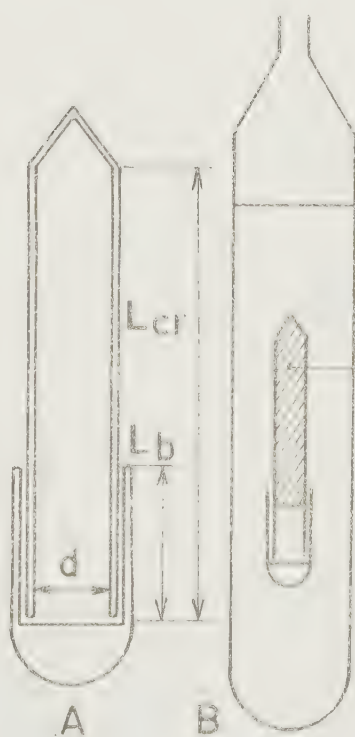


FIGURE 18

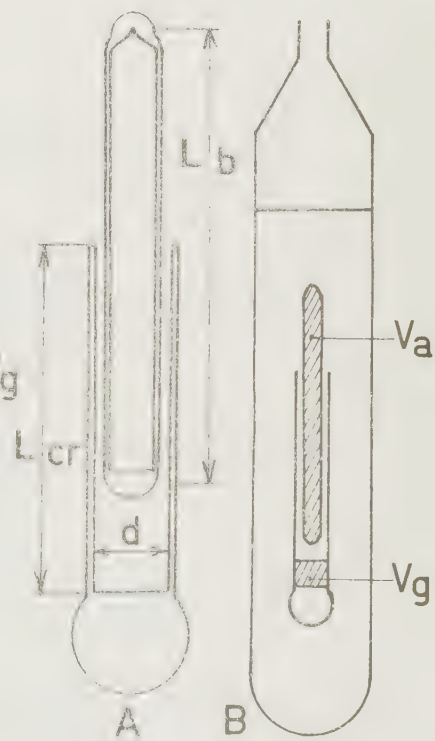


FIGURE 19

- FIGURE 20 : Matériel de fabrication des ludions à bouchon
(a : ampoule, a cp : ajustement capillaire, ba : baguette d'ajustement, c : coupure, cp : capillaire, et : étirage).
- FIGURE 21 : Ludion simple (renversé) pour la mesure du coefficient de diffusion de l'air dans le liquide de flottaison
(Ld : longueur de diffusion, hachuré : air).
- FIGURE 22 : Volume liquide (V_l) en contact avec la bulle gazeuse dans un ludion à bouchon
(b : barrière de diffusion).
- FIGURE 23 : Mise en place d'un kyste et de la bulle d'air dans la chambre respiratoire d'un ludion à bouchon
(hachuré : eau, a : air, cr : chambre respiratoire, k : kyste, p : pipette de garniture en air).

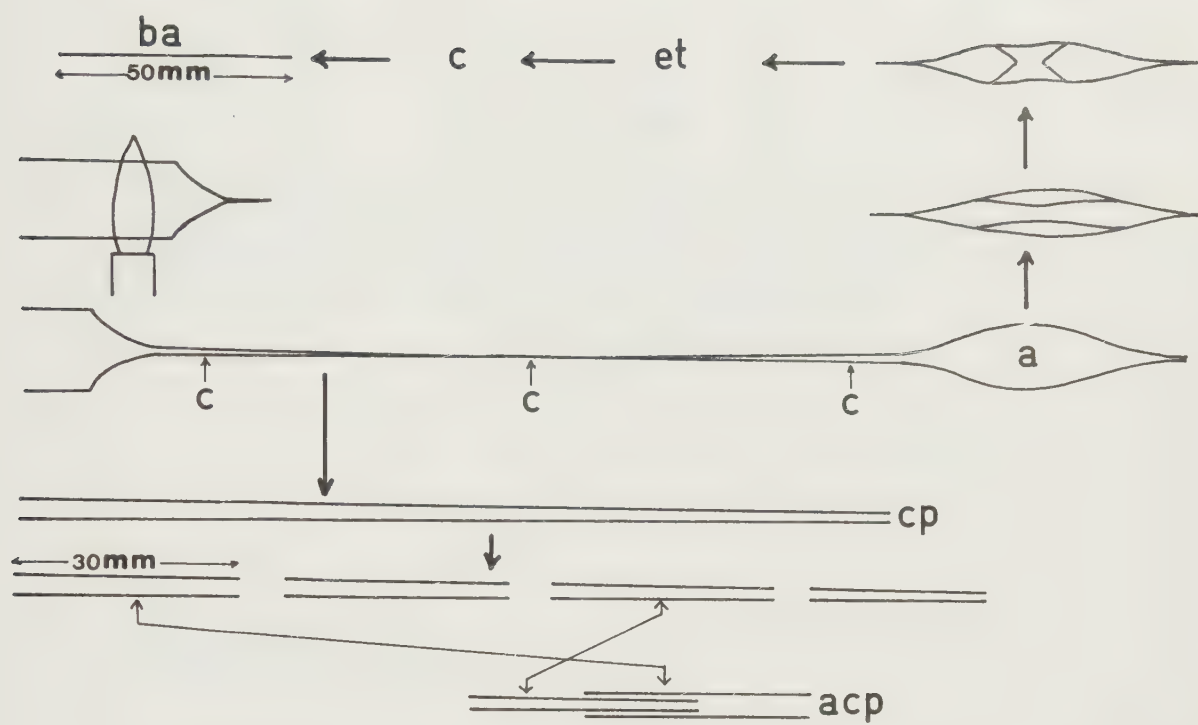


FIGURE 20

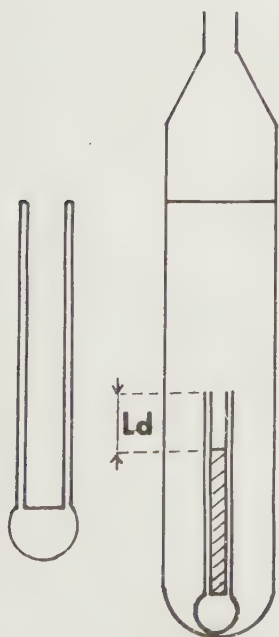


FIGURE 21

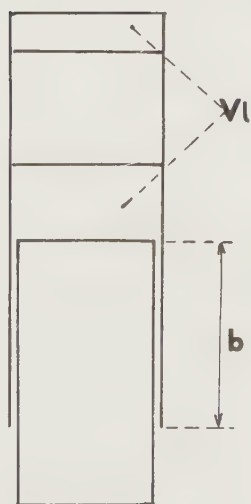


FIGURE 22

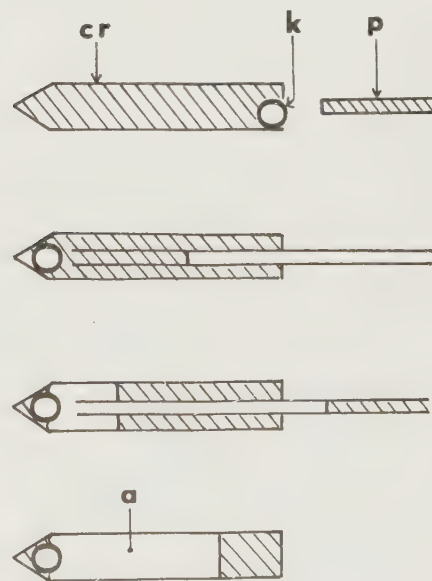


FIGURE 23

FIGURE 24 : Dérive de mesure (blanc)

- A : ludion dans la position de repos (pression H_r)
- B : ludion dans la position d'équilibre (pression H)
- C : cinétique du dégazage du volume V_l pour un ludion à bouchon intérieur ($V_g = 1 \mu l$, $V_l = 2 \mu l$, $H = 400 \text{ mm}$).
 - 1 $H_r - H = 500 \text{ mm d'éthanol}$
 - 2 $H_r - H = 20 \text{ mm d'éthanol}$(Δt : temps d'équilibration, ε : erreur)

FIGURE 25 : Mesure

- H : pression manométrique d'équilibre
- P : pression absolue d'équilibre
- t_0 : instant de chargement et de mise en place du ludion (pression H_0)
- t_1 : date du premier équilibre de mesure (pression H_1)
- t_2 : date du deuxième équilibre de mesure (pression H_2)

FIGURE 26 : Variation du pourcentage d'oxygène dans la phase gazeuse

- $r = f(P_o/P)$ pour un remplissage du ludion réalisé avec de l'air ($r_o = 0,21$)
- $P_o/P = 1,075$: rapport maximum que l'on peut obtenir avec l'appareil ($r_2 = 0,15$)
- $P_o/P = 1,02$: rapport ordinairement obtenu au cours d'une mesure ($H_1 - H_2 = 200 \text{ mm}$, $r_2 = 0,195$, variation relative = 7 %)

FIGURE 27 : Ludions à bouchon intérieur

(hachuré : air)

- A : Modèle utilisé (voir figure 19, L_d : distance de diffusion de l'oxygène)
- B : Modèle inversé (V_l : volume liquide entourant l'animal)

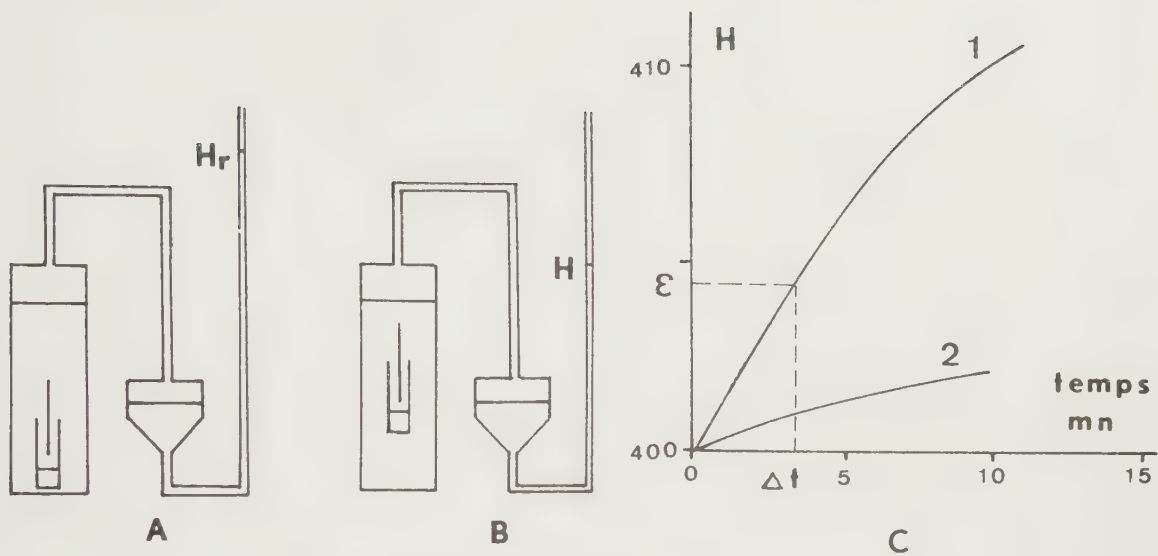


FIGURE 24

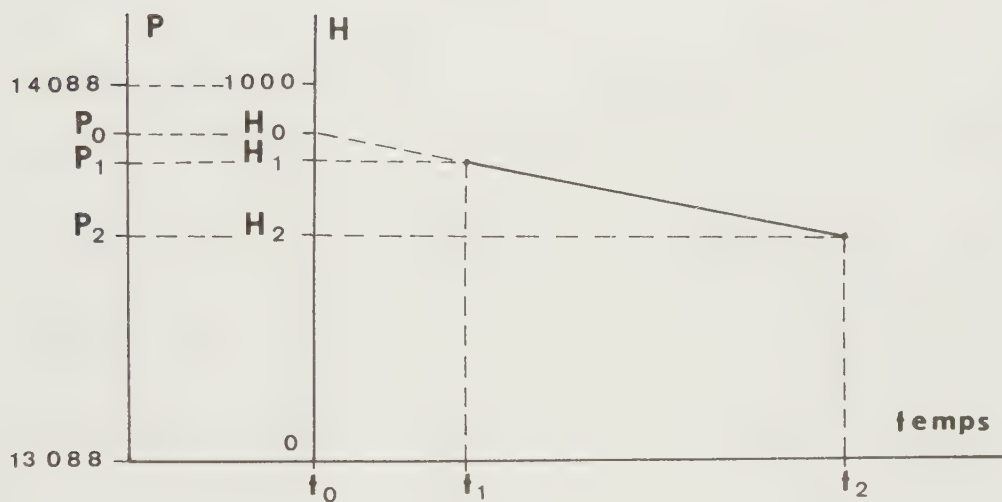


FIGURE 25

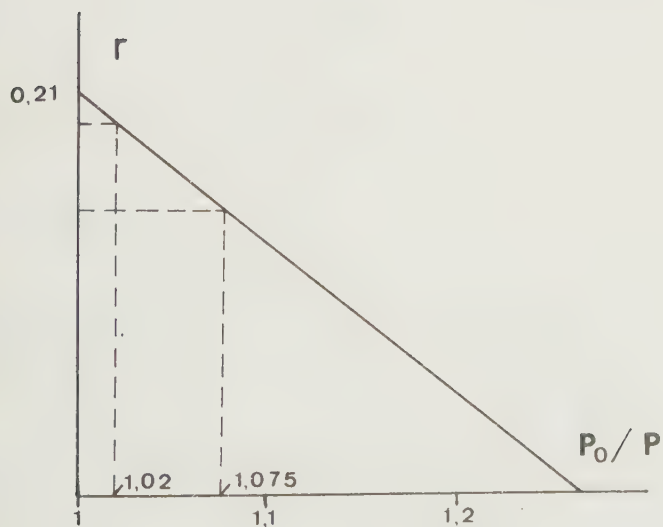


FIGURE 26

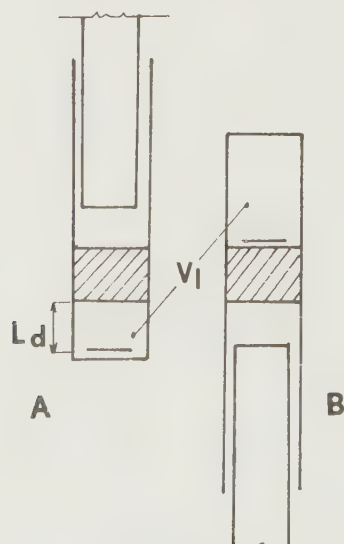
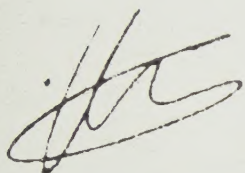


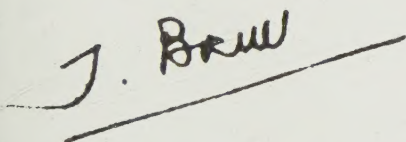
FIGURE 27

Vu.

Les membres du jury :



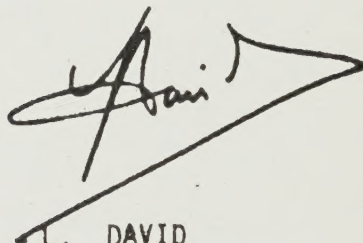
V. NIGON



J. BRUN

Vu et approuvé.

Le Directeur de l'U.E.R.
des Sciences de la Nature

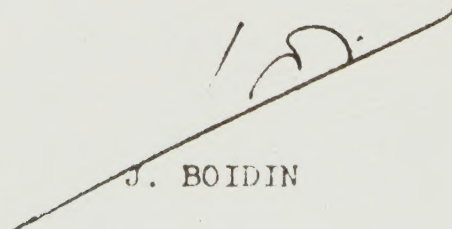
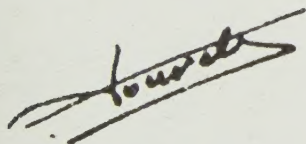


L. DAVID

Vu et accordé le permis d'imprimer.
Lyon, le 19 mai 1971

Le Président de l'Université
Claude Bernard,

J. FOURCHE



J. BOIDIN

